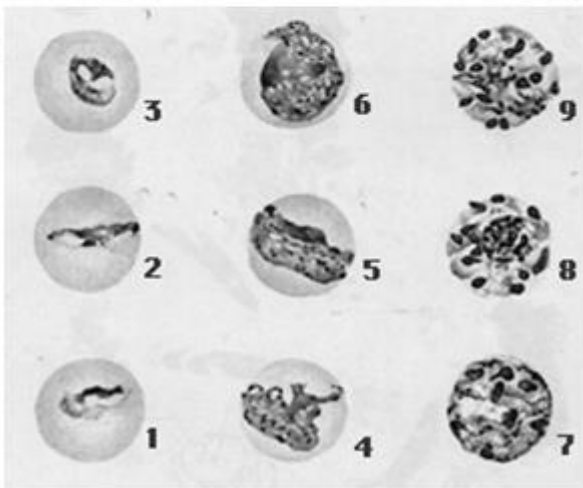
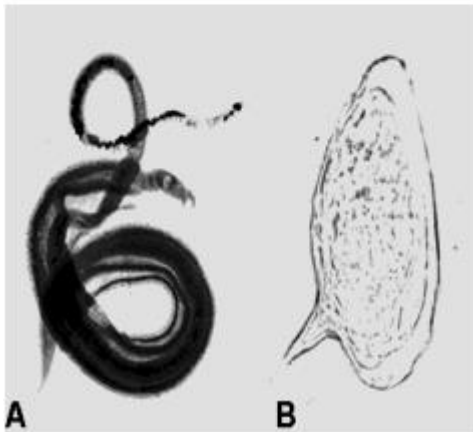
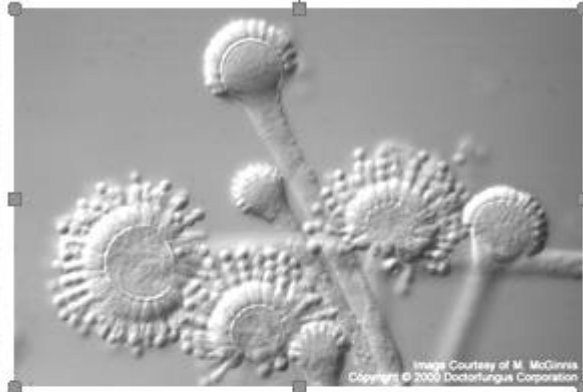
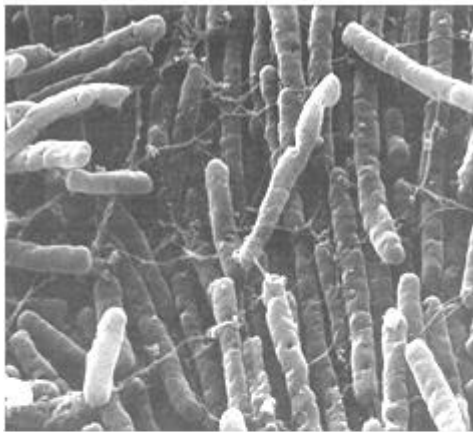


Wintersemester 2025/26



Praktikum Pharmazeutische Mikrobiologie

Name: _____

Kurs vom: _____ bis: _____

Praktikum Wintersemester 2025/26

Verantwortlich: Oberarzt Norman Lippmann, Tel. 0341- 97 20679
(Norman.Lippmann@medizin.uni-leipzig.de)

Studentensekretariat: Frau Leupolt, Tel. 0341- 97 15210, Liebigstr. 21, 2. OG, R. Raum 2059
susann.leupolt@medizin.uni-leipzig.de

Praktikumsort Forschungszentrum
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Infektionsepidemiologie
Liebigstr. 21, 2. OG, R. 2052 + 2053

Praktikumszeiten Mittwoch 12.30 bis 15.00 Uhr

Terminplan

Datum	Praktikum	Thema
22.10.2025	I	Allgemeine Arbeitstechniken
29.10.2025	II	Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien
05.11.2025	III	Antibakterielle Wirkung von Antibiotika
12.11.2025	IV	Die Bakterienflora aus der Umwelt, Antimikrobielle Konservierung
26.11.2025	V	Serologische Verfahren
03.12.2025	VI	Pharmazeutisch mikrobiologische Versuche
10.12.2025	VII	Resistenzplasmide
07.01.2026	VIII	Mykologie
14.01.2026	IX	Parasitologie
21.01.2026	X	Zusammenfassung, Kurzvorträge
05.02.2026		Prüfung
19.02.2026		Wiederholungsprüfung

Inhaltsverzeichnis	Seite
Kursordnung	6
Organisatorische Hinweise	7
Arbeitsschutzbestimmungen	8
Hinweise zur Benutzung des Skriptums	10
Literaturhinweise	11
Zusammensetzung der benutzten Nährmedien	13
Färbelösungen und Färbvorschriften	15
Praktikum I	16
I. Allgemeine Arbeitstechniken	
Aufgabe 1.1.: Mikroskopie	17
Aufgabe 1.2.: Makromorphologie	19
Aufgabe 2: Herstellung von Nährböden	20
Aufgabe 3: Fraktioniertes Beimpfen	21
Aufgabe 4. Anlage eines Nasen/Rachenabstrichs	22
Aufgabe 5. Speichelpräparat	22
Praktikum II	24
II. Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien	
Auswertung Aufgabe 2	25
Auswertung Aufgabe 3	25
Auswertung Aufgabe 4	26
Aufgabe 6: Keimzahlbestimmung	26
Aufgabe 7: Biochemische Charakterisierung	27
Aufgabe 7.1: Erregerdifferenzierung mittels biochemischer Charakterisierung	30
Aufgabe 8: Streptokokken	32
Aufgabe 8.1: Charakterisierung mittels Latexagglutination	32
Aufgabe 8.2: Charakterisierung mittels Hämolyse	33
Aufgabe 8.3: Charakterisierung von Pneumokokken	33
Aufgabe 9: Dickdarmflora	34
Checkliste Praktikum III	35
III. Antibakterielle Wirkung von Antibiotika	
Auswertung Aufgabe 6	36
Auswertung Aufgabe 7.1	36
Auswertung Aufgabe 9	41
Aufgabe 10: Salmonellen-Serotypisierung	41
Aufgabe 11: Antibakterielle Wirkung von AB	47
Aufgabe 11.1: Agardiffusionsionstest	47

Aufgabe 11.2: MHK-Makrobouillondilution	48
---	----

Checkliste Praktikum IV	49
--------------------------------	-----------

IV. Die Bakterienflora aus der Umwelt, Antimikrobielle Konservierung

Auswertung Aufgabe 11.1	50
Auswertung Aufgabe 11.2	51
Aufgabe 11.3 MHK-Mikromethode	51
Aufgabe 12: Bestimmung MBK	55
Aufgabe 13: Antimikrobielle Konservierung	56
Aufgabe 14: Raumluftuntersuchung/Abklatschplatten	59

Checkliste Praktikum V	60
-------------------------------	-----------

Serologische Verfahren

Auswertung Aufgabe 12	61
Auswertung Aufgaben 13	61
Auswertung Aufgabe 14	64
Aufgabe 15: Augentropfenversuch nach 7d	64
Aufgabe 16: TPHA	64
Aufgabe 17: Immundiffusion nach Ouchterlony	65
Aufgabe 18: Diphtherie-Elisa, Westernblot	66

Checkliste VI	69.
----------------------	------------

Pharmazeutisch-Mikrobiologische Versuche	
Auswertung Aufgabe 15	70
Aufgabe 19: Augentropfenversuch nach 21d	70
Aufgabe 20 Bakterizide Wirkung von UV-Licht	70
Aufgabe 21: Absterbevorgang einer Kultur	73
Aufgabe 22: Konzentrationsbestimmung von Antibiotika	74

Checkliste Praktikum VII	76.
---------------------------------	------------

Resistenzplasmide

Auswertung Aufgabe 19	77
Auswertung Aufgabe 20	77
Auswertung Aufgabe 21	79
Auswertung Aufgabe 22	82
Aufgabe 23: Nachweis von Resistenzplasmiden	83

Checkliste Praktikum VIII	87
----------------------------------	-----------

Mykologie

Auswertung Aufgabe 23	88
Aufgabe 24: Sprosspilze	89
24.1: Makroskopie	89

24.2.: Mikroskopie-Nativpräparate	89
Aufgabe 25: Dermatophyten	91
25.1: Kulturmorphologie	91
25.2: Mikroskopie-Klebestreifenpräparat	91
Aufgabe 26: Schimmelpilze	
26.1.Kulturmorphologie	95
26.2 Mikroskopie-Klebestreifenpräparat	96
Checkliste Praktikum IX	98
Parasitologie	
Aufgabe 27: Nachweis von Parasiten im Blut	101
27.1: Dünnere Blutausschreibung	101
27.2: „Dicker Tropfen“	102
27.3: Malaria-Schnelltest aus Vollblutproben (Demonstration)	104
Aufgabe 28: Parasitennachweis im Stuhl	108
Aufgabe 28.1: Nachweis über Anreicherungsverfahren	108
Aufgabe 28.2: Direktnachweis in Stuhlaufschwemmung	112
Checkliste Praktikum X	115
Zusammenfassung und Kurzvorträge	

Kursordnung

Die zu Beginn des Praktikums zugeteilten Plätze sind während der gesamten Praktikumszeit beizubehalten.

Die in den Kapiteln „Arbeitsschutzbestimmungen“ und „Organisatorische Hinweise“ aufgeführten Festlegungen sind strikt einzuhalten. Ihre Anerkennung ist durch jeden Kursteilnehmer zu quittieren. Ihre grob fahrlässige oder bewusste Missachtung kann wegen der Gefährdung anderer den Ausschluss vom Kurs zur Folge haben.

Entscheidungen hierfür treffen die verantwortlichen Lehrkräfte.

Durchführung der praktischen Übungen

Der Kurs besteht aus der selbständigen Durchführung praktischer Übungen unter Anleitung einer Lehrperson im Kurssaal. Vor Beginn der praktischen Arbeiten wird in kleinen Gruppen eine theoretische Einführung in den Stoff des Tages gegeben.

Es wird erwartet, dass die Kursteilnehmer sich anhand des vorliegenden Skriptums auf den jeweiligen Kurstag vorbereitet haben, und dass die praktischen Übungen vollständig durchgeführt werden. Bei grober Nachlässigkeit bei der Durchführung der Übungen oder bei einem schlechten Vorbereitungsstand des Teilnehmers kann eine Lehrkraft festlegen, dass der entsprechende Kurstag als versäumt gilt.

Zu Beginn jedes Kurses findet eine mündliche Kurzkontrolle statt.

Regelmäßigkeit der Teilnahme

Voraussetzung für die Erteilung des Kursscheins sind die Regelmäßigkeit sowie der Nachweis der erfolgreichen Teilnahme.

Nach jedem Kurstag muss der Teilnehmer die Anwesenheit durch eigene Unterschrift in der Tischliste bestätigen. Die durchgeführten Arbeiten werden vom Tischassistenten testiert.

Eine regelmäßige Teilnahme wird bescheinigt, wenn insgesamt nicht mehr als zwei Kurstermine versäumt wurden. Kann die regelmäßige Teilnahme nicht bescheinigt werden, so ist der Kurs insgesamt im nächsten Studienjahr zu wiederholen.

Plätze für Wiederholer können nur nach Maßgabe freier Kursplätze vergeben werden. Über Härtefälle entscheiden die verantwortlichen Professoren.

Erfolgskontrolle

Die erfolgreiche Teilnahme wird durch das Bestehen einer schriftlichen Prüfung, die am Ende des Kurses stattfindet, nachgewiesen. Voraussetzung für die Zulassung zur Erfolgskontrolle (MC-Fragen, 60% richtig zu beantworten) ist die regelmäßige Teilnahme am Kurs im Sinne des vorherigen Abschnitts dieser Kursordnung.

Wiederholung der Prüfung

Die Erfolgskontrolle kann zweimal wiederholt werden. Ein Wiederholungstermin wird nach ca. 14 Tagen angeboten, ein weiterer im nächsten Semester.

Organisatorische Hinweise

- Jeder Platz hat eine Nummer, die mit der Nummer des Mikroskops übereinstimmt. Diese Platznummer benutzen Sie bitte auch zur Beschriftung der von Ihnen angelegten Materialien.
- Für Sie ist ein Mitarbeiter des Institutes zuständig, an den Sie sich mit allen Fragen wenden können und der Ihnen bei der Durchführung der Versuche bzw. Übungen behilflich ist.
- Die Anwesenheitskontrolle wird vom Mitarbeiter des Institutes durchgeführt.
- Die von Ihnen bearbeiteten Materialien bleiben an Ihrem Arbeitsplatz bzw. werden auf Anordnung des zuständigen Kursassistenten eingesammelt.
- Am Ende jedes Praktikums sind die Arbeitsplätze aufzuräumen, die Ölimmersionsobjektive der Mikroskope mit Mikroskop-Reinigungsmittel abzuwischen und die Mikroskope in die vorgesehenen Schränke zu stellen. Defekte und Verluste am Arbeitsgerät sind unverzüglich der verantwortlichen Lehrkraft zu melden.
- Taschen, Rucksäcke usw. dürfen aus Arbeitsschutzgründen nicht mit in die Praktikumsräume genommen werden. Für Ihre Garderobe, Taschen u.ä. übernimmt das Institut keine Haftung.

Es ist zweckmäßig, folgende Utensilien zum Kurs mitzubringen:

- ✓ eine Uhr mit Sekundenzeiger
- ✓ einen Faserstift für Plastik und Glas
- ✓ Bleistift, roten und blauen Buntstift, übliches Schreibgerät
- ✓ eine kleine Lupe (4 - 10fache Vergrößerung)
- ✓ einen Taschenrechner

Arbeitsschutzbestimmungen, Infektionsverhütung

(unter auszugsweiser Nutzung des Merkblattes der Bundesarbeitsgemeinschaft der gemeindlichen Unfallversicherungsträger, München 2, in Zusammenarbeit mit der Berufsgenossenschaft für Gesundheitsdienst und Wohlfahrtspflege, Hamburg 36)

Verhalten im Praktikumsraum

- Jeder Student ist verpflichtet, im Kursraum aus Gründen der Infektionsverhütung einen auf der Vorderseite geschlossenen Kittel zu tragen. **Bringen Sie zum Schutz ihrer Kleidung einen weißen Laborkittel mit.** Zusätzlich erhalten Sie zum Schutz vor Kontamination einen Infektions-Schutzkittel. Dieser wird Ihnen vor Kursbeginn von den Kursassistenten ausgehändigt und verbleibt im Kursraum.
- Bei Arbeiten mit infektiösem Material sind Einmal-Gummihandschuhe zu tragen.
- Zum Schutz vor Schmierinfektionen ist vor dem Benutzen der Armaturen in den Kurzräumen eine hygienische Händedesinfektion durchzuführen (ca. 3,0 ml Desinfektionsmittel auf Handinnenfläche und Handrücken verteilen; mindestens 30 Sek. verreiben und einwirken lassen, evtl. weiteres Desinfektionsmittel anwenden).
- Infektiöses Material ist geeignet zu entsorgen, z.B. gebrauchte Plastikimpfösen in bereitgestellten Behältern mit Desinfektionsmittel, bzw. Kulturen, gebrauchte Handschuhe in speziellen blauen Plastikbehältern. Nicht infektiöses Material wie z. B. Papier, Papierhandtücher ist in gesonderten Abfallbehältnissen (Sackhalter mit blauen Säcken) zu entsorgen.
- Es ist umsichtig und überlegt zu arbeiten, damit für einen selbst und andere keine erhöhte Infektionsgefahr ausgeht (z. B. nichts verspritzen, Aerosolbildung vermeiden, kontaminiertes Material ordnungsgemäß entsorgen, verschüttetes infektiöses Material desinfizieren). Bei der Bearbeitung von Flüssigkeiten und Lösungen sind hektische Bewegungen zu vermeiden. Bitte entsorgen Sie diese Arbeitsmittel umsichtig in die dafür vorgesehenen blauen Plastikbehälter.
- In den Kursräumen darf nichts gegessen, getrunken oder geraucht werden; lange Haare sind zusammenzubinden.
- Schwangere Studentinnen dürfen an den Kursen Mikrobiologie und Virologie nicht teilnehmen.
- In die Kursräume sind nur die nötigsten Utensilien mitzunehmen, kontaminiertes Material darf aus den Kursräumen nicht mitgenommen werden.
- Die Mitnahme von elektronischen Geräten (insbesondere Handys) in den Kursraum ist NICHT gestattet.
- Vor dem Verlassen der Kursräume, am Ende des Praktikumstages und bei Berührung von infektiösem Material ist eine hygienische Händedesinfektion vorzunehmen. Desinfektionsmittelspender sind an den Wänden angebracht (ca. 3,0 ml Desinfektionsmittel auf Handinnenfläche und Handrücken verteilen; mindestens 30 Sek. verreiben und einwirken lassen, evtl. weiteres Desinfektionsmittel anwenden).
- Nach Arbeitsende ist der Arbeitsplatz mit Desinfektionsmittel abzuwischen.
- Kontakt mit oder Verschütten von infektiösem Material sowie Unfälle und besondere Vorkommnisse sind sofort der verantwortlichen Lehrkraft mitzuteilen.

Schutzmaßnahmen gegen Laboratoriumsinfektionen

Bei Infektionen ist so bald wie möglich ärztliche Hilfe in Anspruch zu nehmen. Die nachstehenden Anordnungen sind daher nur als erste Schutzmaßnahmen aufzufassen.

Jede Laboratoriumsinfektion, jede Verletzung durch infizierte Instrumente, jede Beschmutzung von Hautwunden und Schrunden mit infiziertem Material ist ebenso wie jeder Unfall unverzüglich dem Kursleiter zu melden. Ist der Betroffene hierzu nicht imstande, hat die Meldepflicht der Betriebsangehörige, der zuerst von dem Ereignis erfährt.

Die für die Erste-Hilfeleistung erforderlichen Mittel sind in jedem Praktikumsraum in einem geeigneten Schrank an einer allen Beschäftigten bekannten und leicht zugänglichen Stelle trocken, kühl, staubfrei und jederzeit erreichbar bereit zu halten. Die Mittel sind regelmäßig daraufhin zu prüfen, ob sie einwandfrei (genügend frisch) und vollzählig vorhanden sind. In den Arbeitsräumen müssen Einrichtungen zum Waschen mit fließendem Wasser und zum Trocknen der Hände (Einzel- oder Papierhandtücher) bereitgestellt und benutzt werden. Für Hand- und Hautdesinfektionen sind gebrauchsfertige Desinfektionsmittel bereit zu halten.

Besondere Schutzmaßnahmen

Infektiöses Material ist in den Mund gelangt, aber noch nicht geschluckt worden:

Nicht schlucken! Sofort ausspucken! Darauf wiederholt gründlich Mund ausspülen und gurgeln mit frisch angesetzter 0,1 %iger Kaliumpermanganatlösung oder 1%iger Wasserstoffsuperoxydlösung. Jedes Schlucken vermeiden! Zweckmäßig ist, nunmehr wiederholt Brot zu kauen und das zerkaute Brot unter Nachspülen und Gurgeln mit Wasser auszuspucken. Speichel ausspucken! Abschließend soll man zwecks Anregung der Salzsäureabsonderung im Magen Fleischextrakt einnehmen. Mundspülungen sind während der ersten Stunden noch mehrfach zu wiederholen.

Infektiöses Material ist geschluckt worden:

Kurze kräftige Mundspülung und Gurgeln mit 0,1 %iger frisch angesetzter Kaliumpermanganatlösung. Anschließend zwecks Anregung der Salzsäureabsonderung im Magen Fleischextrakt und salzsäurepepsinhaltiges Mittel einnehmen.

Infektiöses Material ist in das Auge gelangt:

Bindehautsack mit fließendem Leitungswasser gründlich ausspülen. In den Augenbindehautsack geratene Krankheitserreger können auf dem Wege des Tränenkanals in die Nase und weiterhin in den Rachen, Mund und Magen gelangen. An die Desinfektion des Auges sind deshalb die unter 1 (Mund) aufgeführten Maßnahmen anzuschließen.

Infektiöses Material ist in die Nase gelangt:

Wiederholtes energisches Ausschnauben in Zellstoff, unter Vermeidung von Einziehen durch die Nase (Luft durch den Mund einholen und bei geschlossenem Munde kräftig durch die Nase ausstoßen). Einstreichen von Betaisodona-Lösung in die Nase. Außerdem sind anschließend die unter 1. (Mund) angegebenen Maßnahmen vorzunehmen.

Verletzungen der Haut durch infizierte Instrumente, Kratzwunden, Beschmutzung von Hautwunden mit infektiösem Material:

Oberflächliche Kratzwunden sofort mit Betaisodona-Lösung überpinseln. Darauf die Umgebung der Wunde abspülen und nach Abtupfen mit Zellstoff die Wunde nochmals mit Betaisodona-Lösung überpinseln. Anschließend Schutzverband!

Stichverletzungen ausdrücken und ausbluten lassen, im Anschluss mit Wasser ausspülen. Einstichstelle/ Wundumgebung wiederholt mit Betaisodona-Lösung betupfen. Anschließend Schutzverband!

Hinweise zur Benutzung des Skriptums

Das vorliegende Skriptum enthält Anleitungen zur Durchführung von Kursexperimenten, die den Studierenden den theoretischen Stoff der Vorlesung veranschaulichen sollen. Darüber hinaus sollen die Studierenden einen Einblick in die Methodik der Diagnostik von infektionsbedingten Krankheiten gewinnen.

Jeder Kursteilnehmer sollte die entsprechenden Teile des Skriptums **vor Beginn der Kursstunde** durchgearbeitet haben. Darüber hinaus sollte jeder Kursteilnehmer das allgemeine Thema, zu dem die durchzuführenden Experimente gehören, in einem Lehrbuch studiert haben. Entsprechende Literaturangaben finden sich im Kapitel „Literaturhinweise“.

Üblicherweise sind die im Praktikum und in den Vorlesungen vermittelten Inhalte für Sie prüfungsrelevantes Wissen.

Um die im „Praktikum“ vermittelten Inhalte besser zu verstehen und Zusammenhänge zu erschließen, empfehlen wir Ihnen, sich auf jedes Praktikumsthema gezielt vorzubereiten.

Literaturhinweise

Lehrbücher

- Neumeister B., Geiss H., Braun R., Kimmig, P.: „Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie“
2. Auflage, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2009.

Kurzlehrbücher

- Hof, H., Dorries R. (Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie“
6. Auflage, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2017.
- Groß, U.: „Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“
3. Auflage, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2013.
- Suerbaum, Burchard (Hrsg.): „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“
8. Auflage (25. Juli 2016), Springer Verlag, ISBN-10: 3662486776

Klinische Fälle

- Brochert, A.: „Mikrobiologie. Von Fall zu Fall. 50 Express-Fälle für die Prüfung.“
Elsevier GmbH, München 2005 [*relativ alte Auflage, aber noch gut verwendbar – und studentenfreundlich!*].

Impfmedizin

- Jilg W.: „Der Impfkurs. Eine Anleitung zum richtigen Impfen.“
4. Auflage, ecomed Medizin, Landsberg am Lech 2018.
- Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut (STIKO): „Impfempfehlungen 2017/2018“
Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald 2018 [*jährlich aktualisiert*].

Apps

- Lübbert, C., Dürrbeck A., Ranft D., Schuster V., Rodloff A.:
„Antiinfektiva – Leitfaden für die empirische antiinfektive Therapie und Prophylaxe“
2. Auflage, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig 2016 [*im App-Store für ca. 3€*].
- Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut (STIKO): „STIKO@RKI Informationen rund ums Impfen“
Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald 2018 [*ständig aktualisiert, kostenfrei*].

Interessantes und Wissenswertes

- Dixon, B.: „Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte – und andere Geschichten aus der Welt der Mikroorganismen“
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 2009.
- Antibiotikaquartett
Herausgeber: Jan Kruse und Philipp Enghard

Internet-Links

Erreger und Krankheiten

- <http://www.rki.de/> (Robert Koch-Institut)
- <https://www.cdc.gov/DiseasesConditions/> (CDC)

Therapiehinweise/-Leitlinien

- <http://www.awmf.org/leitlinien/aktuelle-leitlinien.html/> (AWMF)
- <http://www.p-e-g.de/> (Paul-Ehrlich-Gesellschaft)
- <https://www.uptodate.com/contents/search/>
- <https://www.dtg.org/> (Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft)

Impfmedizin

- https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/stiko_node.html/ (STIKO)
- <https://www.slaek.de/de/03/impfen.php/> (SIKO)

Infektionsepidemiologie

- <http://www.rki.de> (Robert Koch-Institut)
- <https://survstat.rki.de/> (epidemiologisches Abfrage-Programm vom RKI)
- <https://influenza.rki.de/> (aktuelle Influenza-Karte)
- <https://map.ox.ac.uk/> (Malaria-Karte)
- <https://ecdc.europa.eu/en/home> (ECDC)
- <https://www.cdc.gov/DataStatistics/> (CDC)
- <http://www.promedmail.org/> (Karte über globale Ausbrüche, Epidemien, Pandemien)

Spezielle Pathogene

- *Parasiten*
<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx.Default.htm>
- <https://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html
- <http://www.dtg.org/>
- <http://www.zoonosen.net/>
- https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/merkblaetter_node.html
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
https://de.wikibooks.org/wiki/Medizinische_Mikrobiologie:_Helminthen
- *Pilze*
<http://www.mycology.adelaide.edu.au>

Kurzinformationen zu einigen im Kursskript erwähnten Nährböden

Nährbouillon:

- Fleischextrakt, Pepton, NaCl, pH 7,2
- Grundnährmedium zur Anzucht anspruchsloser Bakterien

Nähragar:

- Nährbouillon + Agar, pH 7,2
- Grundnährmedium zur Anzucht anspruchsloser Bakterien

BHI-Bouillon: *Brain-Heart-Infusion* (Hirn-Herz-Aufguss)

- Pepton, Glukose, NaCl, Na₂HPO₄, pH 7,2
- hochwertiges Universalnährmedium zur Züchtung anspruchsloser sowie anspruchsvoller Bakterien

Columbia-Blutagar:

- Spezialpepton, Stärke, NaCl, Agar, pH 7,2, 5 % Schafblut
- Universalnährboden

Columbia-Blutagar für Anaerobier:

- Zusammensetzung wie Columbia Blutagar, zusätzlich supplementiert mit Vitamin K und Hämin
- ggf. mit Zusatz eines Aminoglykosidantibiotikums (Gentamicin) zur Hemmung fakultativ anaerober Keime

Kochblut- oder Schokoladenblutagar:

- durch 5 min. Erhitzen des bluthaltigen Nährbodengemischs bei 100 °C (Dampftopf) werden Faktor X (Hämin) und V (NAD) für Bakterien verfügbar
- Universalnährmedium, zur Anzucht von *Haemophilus* sowie anderen anspruchsvollen Spezies geeignet

MacConkey-Agar:

- Pepton, Laktose, NaCl, Gallensalzmischung, Neutralrot, Kristallviolett, Agar-Agar
- Selektiv- und Differentialnährmedium für Gram negative Bakterien
- grampositive Bakterien wachsen nicht oder nur sehr schwach (Hemmung durch Kristallviolett und Gallensalze)
- Wachstum von Vertretern der Enterobacterales und sog. „Nonfermentern“ wie *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. u. a.

Leifson-Agar: (Desoxycholat Citrat-Agar)

- Pepton, Fleischextrakt, Laktose, Natriumdesoxycholat, Eisen III citrat, Natriumcitrat, Natriumthiosulfat, Neutralrot Agar
- Erkennen von Laktose positiven Bakterien (rot), Laktose negativen Bakterien (hell, in der Farbe des Nährbodens), H₂S-positiven Bakterien (Kolonien in der Mitte schwarz durch Eisensulfid)
- Selektiv- und Differentialnährmedium für Salmonellen und Shigellen
- andere Enterobacterales werden mehr (*E. coli* u. ä.) oder weniger (*Proteus* spp.) gehemmt

Galle-Äsculin-Agar:

- Pepton, Hefeextrakt, NaCl, Trockengalle, Äsculin, Ammoniumeisen(III)-citrat, Kanamycinsulfat
- Selektiv- und Differentialnährmedium für Enterokokken, Kolonien färben sich schwarz
- (Spaltung des Glykosids Äsculin in Äsculetin und Glukose, Äsculetin reagiert mit Fe³⁺ zu einem dunkelbraunen/schwarzen Komplex)

Sabouraud-Dextrose-Agar:

- Pepton aus Sojamehl, Glukose, Agar, Chloramphenicol zur Unterdrückung des Wachstums von Bakterien
- Selektivmedium zur Anzucht von Pilzen (Sprosspilze, Schimmelpilze, Dermatophyten)

Müller-Hinton-Agar:

- Rindfleischauflage, hydrolysiertes Casein, Stärke
- Agar Referenzmedium zur *in vitro* Empfindlichkeitstestung
- Für die Empfindlichkeitstestung anspruchsvoller Bakterien wird dem Medium 5 % Schafblut zugesetzt

Färbungen und Färbelösungen

Vorarbeiten

Für alle Färbungen den Objektträger von unten mit einem Fettstift markieren und das geschliffene Feld von oben für die Beschriftung (mit Bleistift) benutzen. Einen Tropfen NaCl innerhalb der Markierung aufbringen, wenig (!) Material einreiben, gleichmäßig verteilen, lufttrocknen lassen, hitzefixieren.

Methylenblau

Es handelt sich um eine unspezifische Proteinfärbung, welche alle Bakterien- und Körperzellen blau färbt. Sie dient der Beurteilung des Vorhandenseins und der Form und Lagerung von Bakterien.

Objektträger in Färbeküvette stellen, Farbe **2 min** einwirken lassen, mit Leitungswasser abspülen, zwischen Filterpapier trocknen, dann mikroskopieren.

Gram-Färbung

Sie dient der Differenzierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien anhand ihrer Zellwandstruktur sowie der Beurteilung von Form und Lagerung der Bakterien.

- Objektträger **2 min** in **Carbolgentianaviolett** stellen
- mit Leitungswasser abspülen
- **2 min** in **Lugolsche Lösung**
- mit **Alkohol** entfärben, bis keine Farbwölkchen mehr abgehen (10-20 Sek.)
- mit Leitungswasser abspülen
- **1 min** in (1:10) **verdünntes Carbofuchsin** stellen
- mit Leitungswasser abspülen
- Zwischen Filterpapier trocknen

Giemsa Färbung

Beste Darstellung von Parasiten und Körperzellen.

- dünnen Blutaussstrich **5 min** in Methanol fixieren
- anschließend **30 min** in frisch hergestellter **Giemsa-Gebrauchslösung**
- (3,5ml Giemsa-Stammlösung + 96,5ml Weise-Puffer) färben
- abkippen und zum Lufttrocknen senkrecht aufstellen
- mit Ölimmersion und 100er Objektiv auswerten

Praktikum I

Allgemeine Arbeitstechniken

1. Charakterisierung von Bakterien mittels Makro- und Mikromorphologie
2. Nährboden herstellen, Fingerabdruck
3. Fraktionierter Ausstrich, Reinkultur
4. Anlage eines Rachen - / Nasenabstrichs
5. Speichelpräparat

Stichworte zur Vorbereitung des Praktikums

Mikrobiologische Kulturmedien:

- Bedeutung von Nährmedien in der Mikrobiologie
-
-

- Universal-/Selektiv-/Differentialnährmedien
-
-

Anzucht und Identifizierung von Bakterien:

- Reinkultur
-
-

- Isolierung
-
-

- Fraktionierung
-
-

- aerobe/anaerobe/fakultativ anaerobe Bakterien
-
-

Mikroskopie:

- Gramfärbung
-
-

- Methylenblau-Färbung
-
-

Physiologische Bakterienflora:

- Haut
-
-

- Mundhöhle
-
-

- Nasopharynx
-
-

1.: Charakterisierung von Bakterien

Aufgabe 1.1.: Charakterisierung verschiedener Bakterien mittels Durchlicht-Mikroskopie (Mikromorphologie)

Zielstellung

Kennenlernen der Möglichkeit, Bakterien durch Analyse der Mikromorphologie zu differenzieren.
Erkenntnis der Bedeutung spezieller Bakterienfärbungen.

Materialien:

- Mikroskop
- Objektträger
- Bunsenbrenner
- Pinzette
- kalibrierte sterile Ösen (10 µl)
- Uhr
- Methylenblau-Lösung (am Färbetisch)
- Materialien für die Gramfärbung (am Färbetisch): Carbol-Gentianaviolett-Lösung, Jod-Kaliumjodid-Lösung (= Lugolsche-Lösung), Fuchsinlösung, 96%iges Ethanol
- Bakterienkulturen von *Staphylococcus aureus* ①, *Neisseria meningitidis* ②, *Escherichia coli* ③, *Corynebacterium diphtheriae* ④
- Streptokokken als Bouillonkultur (Thioglykolatbouillon)

Anleitung Ölimmersions-Mikroskopie:

- Immersionsobjektiv (100er Objektiv mit schwarzem Ring) in den Strahlengang bringen
- Präparat auflegen, 1 Tropfen Immersionsöl pro Feld aufbringen
- unter seitlicher Sicht Objektiv in das Öl eintauchen und ganz dicht an das Präparat gehen
- mit Feintrieb Objektiv langsam heben, bis sich die optische Ebene des Präparates abbildet
- nach Beendigung der Mikroskopie Immersionsobjektiv (Linse) und ggf. Kreuztisch mit Ethanol-getränktem weichem Zellstoff abwischen
- anschließend die gefärbten Präparate in die Abwurfbehälter für infektiöses Material entsorgen

Methylenblau-Präparate

(*Staphylococcus aureus* ①, *Neisseria meningitidis* ②, *Escherichia coli* ③, *Corynebacterium diphtheriae* ④)

- Objektträger mit Fettstift von unten in 2 Felder teilen, mit Platznummer und Keimart auf dem Mattrand beschriften
- in jedes Feld einen kleinen Tropfen sterile NaCl-Lösung geben
- geringe Menge Bakterienmasse mit Öse von der Platte einreiben
- lufttrocknen lassen
- hitzefixieren = luftgetrocknetes Präparat mit der beschichteten Seite nach oben mit der Pinzette 3 -5 x durch die heiße Bunsenbrennerflamme ziehen
- dann Methylenblaufärbung entsprechend den Aushängen an den Färbetischen durchführen

- Ölimmersionsmikroskopie

Grampräparate

(*Staphylococcus aureus* ①, *Neisseria meningitidis* ②, *Escherichia coli* ③, *Corynebacterium diphtheriae* ④)


- Vorbereitung der Objektträger einschließlich der Hitzefixierung wie beim Methylenblaupräparat beschrieben (s. o.)
- jeweils 2 Erreger pro Objektträger
- dann Gramfärbung entsprechend den Aushängen an den Färbetischen durchführen
- Ölimmersionsmikroskopie

Grampräparat aus einer mit Streptokokken bewachsenen Bouillon

- Objektträger markieren und auf dem Mattrand beschriften
- 1 Tropfen Streptokokkenbouillon ohne NaCl auf das markierte Feld geben und vorsichtig etwa eurostückgroß ausbreiten
- Lufttrocknen, hitzefixieren, Gramfärbung

Auswertung

- Fertigen Sie mikroskopische Zeichnungen der Erreger an:

Erreger	Methylenblaupräparat	Grampräparat	Beurteilung des Grampräparates nach Form, Lagerung und Färbeverhalten
① <i>Staphylococcus aureus</i>			
② <i>Neisseria meningitidis</i>			
③ <i>Escherichia coli</i>			
④ <i>Corynebacterium diphtheriae</i>			
Streptokokken (aus Bouillonkultur)			

Aufgabe 1.2.: Charakterisierung des Wachstums bzw. der Koloniemorphologie verschiedener Bakterienstämme auf unterschiedlichen Nährböden (Makromorphologie)

Zielstellung

Erkenntnis, dass unterschiedliche Bakterien verschiedene Nährbodenansprüche stellen und unterschiedliche Kolonieformen ausprägen, was zur Differenzierung bzw. Identifizierung von Bakterien von großem Nutzen ist.

Materialien für 2 Studenten:

Reinkulturen von folgenden Stämmen: ① *Staphylococcus aureus*, ② *Neisseria meningitidis*, ③ *Escherichia coli*, ④ *Corynebacterium diphtheriae*
auf folgenden Nährböden:

- Columbia-Blutagar
- Kochblutagar (= Schokoladenagar)
- MacConkey-Agar
- Nähragar

Durchführung

Beschreibung des Wachstums und der Koloniemorphologie (Größe [Höhe und Breite], Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, Randstruktur, Farbe). Falls vorhanden, Lupe benutzen.

Auswertung

Stamm-Nr.	Columbia-Blutagar	Kochblutagar	MacConkey-Agar	Nähragar
①				
②				
③				
④				

Form der Bakterienkolonien: Beschaffenheit der Oberfläche in der Aufsicht



rund



gezackt

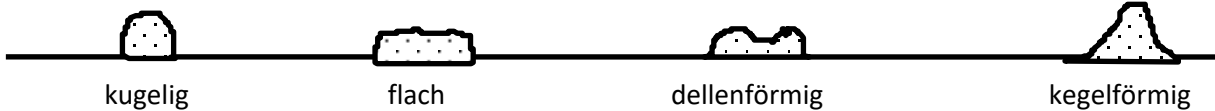


glatte Oberfläche



raue Oberfläche

Form der Bakterienkolonien im Querschnitt:



kugelig

flach

dellenförmig

kegelförmig

2.: Herstellung eines Nährbodens (Blutagar)

Zielstellung

Umgang mit Nährböden. Übung und Überprüfung des sterilen Arbeitens, transiente Flora der Fingerkuppen.

Materialien für jeden Studenten:

- Kolben im Wasserbad mit verflüssigtem Nähragar bei ca. 56°C
- 1 sterile Petrischale
- 1 Röhrchen mit 1 ml defibriniertem Hammelblut

Durchführung

- Petrischale mit Platznummer auf der Petrischalenunterseite (tief) beschriften.
- 1 ml Blut in die Petrischale geben, Deckel (flach) dabei so wenig und so kurz wie möglich öffnen.
- 19 ml Nähragar aus dem Kolben in die Petrischale geben
- Durch vorsichtiges Schwenken der Platte das Blut gleichmäßig verteilen und die Mischung erstarren lassen.
- Platte umkehren (Deckel unten, Boden mit Nähragar oben),
- mit Fettstift Boden in der Mitte teilen, Hälften mit 1 und 2 beschriften.
- Nährbodenhälfte 1: zwei Fingerkuppen leicht für 1-2 sec. andrücken. Davor die Hände NICHT desinfizieren!
- Nährbodenhälfte 2: nach Überziehen eines Schutzhandschuhes wieder zwei Fingerkuppen leicht für 1-2 sec andrücken.
- **Achtung:** Die Nährbodenoberfläche soll nicht beschädigt werden.
- Die Platten mit dem Deckel nach unten am Platz stehen lassen.

3.: Fraktioniertes Beimpfen eines Nährbodens mit einer Bakterien-Mischkultur

Zielstellung

Es soll erlernt werden, wie Untersuchungsmaterial auf Nährböden ausgestrichen wird. Die in dem Material vorhandenen Bakterien sollen schließlich einzeln bzw. getrennt voneinander auf dem Nährboden liegen. Das ist die Voraussetzung, um Reinkulturen zu gewinnen.

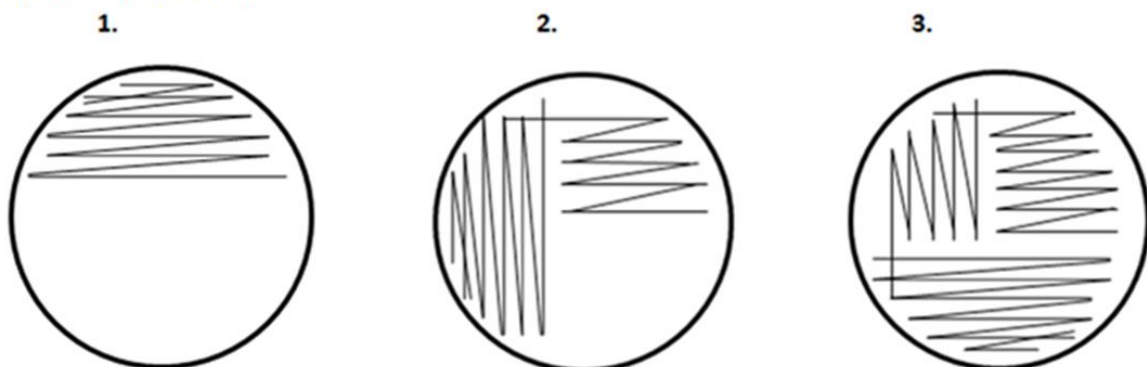
Materialien für jeden Studenten:

- Röhrchen mit einer Bakteriensuspension
- Columbia-Blutagarplatte
- kalibrierte sterile Ösen (10 µl)

Durchführung

- Blutagarplatte mit Platz-Nr. auf der Unterseite beschriften.
- Unter sterilen Bedingungen eine Öse voll Suspension aus dem Röhrchen entnehmen.
- Rechtshänder nehmen die Nähragarplatte in die linke Hand und streichen, mit der Öse in der rechten Hand, die Bakteriensuspension wie dargestellt auf einem Plattensektor aus.
- Der Ausstrich erfolgt auf der Oberfläche des Mediums! Ein Eindringen in den Agar ist zu vermeiden.
- Öse anschließend in Behälter mit Desinfektionsmittel geben.
- Platte gegen den Uhrzeigersinn drehen. Mit zweiter Öse **einmal** durch den Ausstrich gehen und wiederum einen Sektor ausstreichen.
- Öse in Desinfektionsmittel abwerfen.
- Platte gegen den Uhrzeigersinn drehen. Mit dritter Öse einmal durch den zweiten Ausstrich gehen und wiederum ausstreichen.

„Drei-Ösen-Ausstrich“



Durch den Wechsel der Impfösen und das nur einmalige Durchstreichen durch den Ausstrich soll sich jeweils ein Verdünnungsfaktor von 1:10 ergeben.

4.: Anlage eines Rachen- und eines Nasenabstriches

Es soll die Unterschiedlichkeit zweier eng benachbarter ökologischer Nischen deutlich gemacht werden.

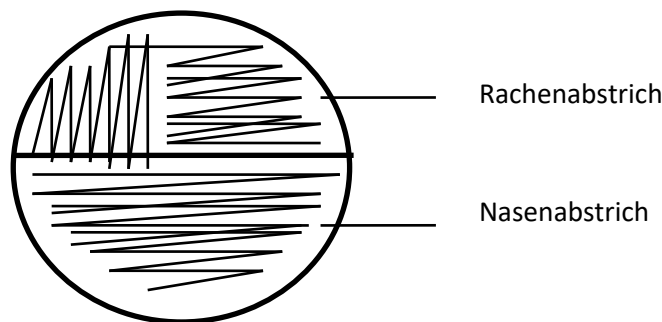
Material

- 1 Blutagarplatte + 1 MRSA Platte
- 2 sterile Tupfer
- sterile Ösen

Durchführung

Mit Hilfe eines sterilen Tupfers werden die Tonsillen im hinteren Rachenraum abgestrichen und das anhaftende Material auf ein Viertel einer Blutplatte abgerollt. Davon ausgehend, wird das Material mit einer sterilen Plastiköse über das zweite Viertel ausgestrichen.

Mit einem zweiten Tupfer wird entsprechend Material von der Nasenschleimhaut abgestrichen, das auf der zweiten Hälfte der Blutagarplatte ausgestrichen wird. Wegen der niedrigen Keimzahl wird hier das Material nicht mit der Plastiköse verdünnt (s. Zeichnung).



Die Platte wird über Nacht bei 37°C bebrütet und dann ausgewertet

5.: Anfertigung eines Speichelpräparates

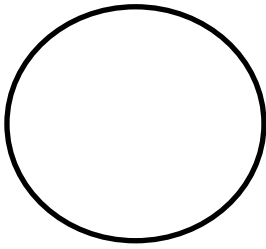
Die mikroskopische Untersuchung von Speichel lässt die Vielfalt der physiologischerweise in der Mundhöhle vorkommenden Bakterien erkennen.

Durchführung

- Mit einem sterilen Wattetupfer wird ein Abstrich von der eigenen Wangenschleimhaut entnommen.
- Dazu wird der Tupfer fest angedrückt und an der Schleimhaut gerieben.
- Dann wird das Material auf einen Objektträger (Stelle mit Fettstift von unten markieren) ausgestrichen.
- Das Präparat wird bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend fixiert und nach Gram gefärbt.

Auswertung

Zeichnen Sie das Präparat, nachdem Sie eine geeignete Stelle gefunden haben.



Welche Bakterien lassen sich anhand des mikroskopischen Bildes charakterisieren? Beurteilen Sie Anfärbung, Form, Größe und Lagerung der Zellen zueinander.

1.
2.
3.

BITTE NEHMEN SIE IHR STUHLRÖHRCHEN MIT !!!!!

PRAKTIKUM II

Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien

- Auswertung Aufgabe 2: Nährboden mit Fingerabdruck
- Auswertung Aufgabe 3: fraktionierter Ausstrich
- Auswertung Aufgabe 4: Rachen- /Nasenabstrich
- 6: Keimzahlbestimmung
- 7: Erregeridentifizierung- und differenzierung

7.1. biochemische Charakterisierung

- 8. Streptokokken
 - 8.1. Latexagglutination
 - 8.2. Hämolyse
 - 8.3. Pneumokokken-Latexagglutination
- 9. Ansatz Stuhlprobe

Auswertung Aufgabe 2 vom letzten Kurs: Gießen einer Blutagarplatte, transiente Flora der Fingerkuppen

Ist es beim Gießen zu mikrobiellen Verunreinigungen gekommen? Nennen Sie mögliche Ursachen?

Beschreiben Sie die Andruckstellen der Fingerkuppen:

a) ungeschützt

b) durch Handschuh geschützt

Entsorgen Sie anschließend die selbst hergestellte Blutagarplatte!

Auswertung Aufgabe 3 vom letzten Kurs: fraktionierter Ausstrich

Was ist das Ziel der fraktionierten Beimpfung einer Agarplatte?

Liegt auf der Agarplatte eine Rein- oder eine Mischkultur vor? Begründen Sie Ihre Antwort, beschreiben Sie die Kolonien.

Ist es gelungen, die Keime so auszustreichen, dass von unterschiedlichen Bakterienspezies Reinkulturen angelegt werden könnten? Wozu benötigt man Reinkulturen?

Fertigen Sie von den unterschiedlichen Kolonien jeweils ein Grampräparat an. Beschreiben Sie die Mikromorphologie.

Auswertung Aufgabe 4 vom letzten Kurs : Rachen- und Nasenflora

Beschreiben Sie und diagnostizieren Sie die gewachsenen Kolonien. Achten Sie besonders auf Größe, Oberfläche und Form der Kolonien. **Nehmen Sie Ihre Ergebnisse der Aufgabe 1.2 (Seite 19) (1. Praktikum) zur Hilfe.**

Flora des Rachens

vorwiegend:

andere Arten:

Flora der Nase

vorwiegend:

andere Arten:

6: Keimzahlbestimmung

Die Zahl lebender Bakterienzellen wird dadurch ermittelt, dass Verdünnungen des Untersuchungsmaterials in steriler physiologischer Kochsalzlösung auf die Oberfläche von Nährböden aufgebracht werden. Nach 18 stündiger Inkubation werden die Kolonien gezählt. Entsprechend des ausgespatelten Volumens und der Verdünnung kann die Keimzahl / ml Originalsuspension berechnet werden.

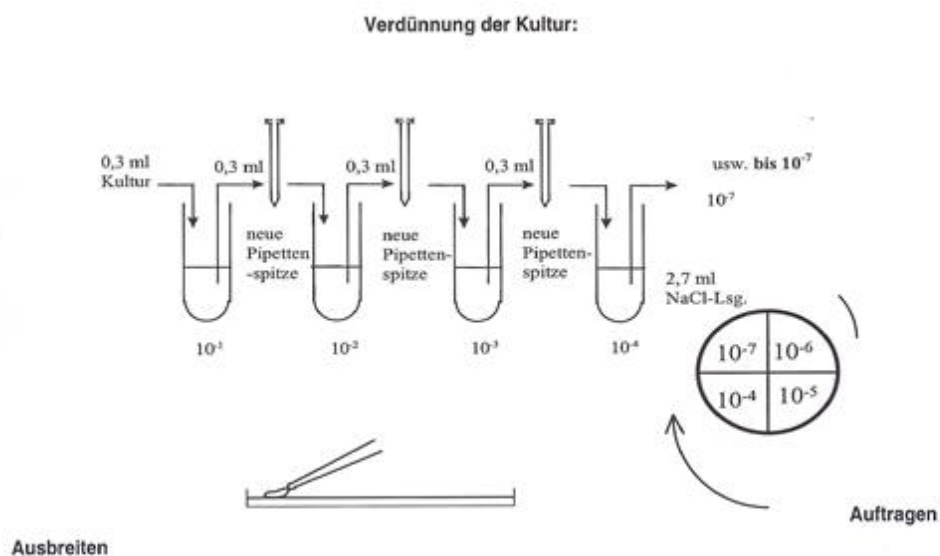
Material für 2 Studenten

- Bouillonkultur
- 7 Röhrchen mit je 2,7 ml sterilem NaCl
- Nähragarplatte
- sterile Pipettenspitzen
- Eppendorfpipette
- sterile 10 µl Ösen

Durchführung

- 0,3 ml des Untersuchungsmaterials (Bouillonkultur) werden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze und der entsprechenden Pipettierhilfe (vorher auf Einstellung achten) in 2,7 ml sterile NaCl-Lösung übertragen.
- Dabei darf die Pipettenspitze nicht in die Verdünnungslösung eintauchen.
- Die Verdünnung wird gemischt, die Pipettenspitze wird in den Behälter geworfen.
- Mit einer neuen sterilen Pipettenspitze wird (nach gründlichem Mischen) 0,3 ml aus der eben hergestellten 1:10-Verdünnung entnommen und in 2,7 ml sterile NaCl-Lösung gegeben (1:100-Verdünnung).
- Weiter arbeiten wie oben beschrieben und dabei auf ständigen Wechsel der Pipettenspitzen achten.

- Nach dem Erstellen der ganzen Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-7}) werden jeweils 10 μ l (gefüllter! Ring der Plastiköse entspricht 10 μ l) der Verdünnungen 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} auf je ein Viertel einer Nähragarplatte aufgetragen und auf einem Quadranten verteilt.
- Dabei kann man mit einer Plastiköse auskommen, wenn man mit der höchsten Verdünnung (10^{-7}) beginnt und schrittweise über 10^{-6} und 10^{-5} die 10^{-4} -Verdünnung als letzte aufträgt.
- Nachdem die Flüssigkeit in den Agar eingezogen ist, werden die Platten umgedreht (Agarschale nach oben)
- Danach erfolgt die Bebrütung für 24 Stunden bei 37°C.
- Nachdem Sie die Keimzahlbestimmung technisch durchgeführt und die Agarplatte 24 h bei 37°C bebrütet haben, können Sie die Keimzahl (Zahl der koloniebildenden Einheiten, KBE) bestimmen.



Erregeridentifizierung- und differenzierung

7. Biochemische Charakterisierung

Ganz allgemein können Mikroorganismen eine große Zahl der verschiedensten biochemischen Reaktionen durchführen. Jede Bakterienart besitzt einen genetisch fixierten Satz von Enzymen, der durch seine Limitierung spezifisch für die Art ist. Diese Tatsache nutzt man aus, um Bakterien zu identifizieren und sie somit zu klassifizieren. Fast jede organische Substanz kann als Substrat für irgendeinen Mikroorganismus dienen. Innerhalb einer Spezies sind allerdings nur wenige Reaktionen grundsätzlich, also zu 100 %, positiv oder grundsätzlich negativ. In einer Spezies können also Stämme zusammengefasst sein, die sowohl für eine bestimmte Reaktion negativ als auch positiv sein können. Moderne Klassifikationssysteme arbeiten daher nicht mit dichotomen Entscheidungen, sondern mit statistischen Werten. **Voraussetzung für eine**

derartige Charakterisierung ist das Vorliegen von Reinkulturen. Man geht deswegen von einer einzigen Kolonie aus, wenn man derartige Prüfungen durchführen will.

Nachfolgend finden Sie eine Übersicht zu einzelnen Reaktionen:

TDA - Tryptophan-Deaminase:

Das Enzym Tryptophan-Deaminase katalysiert die Deaminierung von Tryptophan zu Indolbrenz-Traubensäure und Ammonium. Die Indolbrenz-Traubensäure wird durch die Zugabe von Eisen (III)-Chlorid, das zu braunem Eisen (II)-Chlorid reduziert wird, nachgewiesen.

H₂S - Schwefelwasserstoff:

Schwefelwasserstoff kann hauptsächlich durch zwei Enzyme, die Cystein-Desulfurase oder die Thiosulfat-Reduktase, gebildet werden. In der Anwesenheit von zweiwertigen Schwermetallionen, wie Eisen-(II)-Ionen, wird ein schwarzes Präzipitat von Eisensulfit gebildet. In Stämmen von *Proteus vulgaris* und *Citrobacter freundii* werden beide Enzyme gebildet, während hingegen bei *Salmonella Typhi* nur die Cystein-Desulfurase auftritt.

ESC - Äsculin:

Äsculin, ein β -Glykosid, wird durch eine bakterielle β -Glukosidase zu Glukose und Äsculetin hydrolysiert. Äsculetin bildet bei der Anwesenheit von Eisenionen einen schwarz-braunen Komplex, der präzipitiert. Diese Reaktion ist für die Genera *Klebsiella* und *Serratia* charakteristisch.

IND - Indol:

Der Enzymkomplex Tryptophanase deaminiert und hydrolysiert Tryptophan zu Indol, Brenz-Traubensäure und Ammoniak. Mit dem Reagens p-Dimethylammonium-Zimtaldehyd bildet Indol einen roten Farbkomplex.

URE - Urease:

Das Enzym Urease hydrolysiert Harnstoff zu Ammoniak. Dies macht sich durch eine Erhöhung des pH-Wertes und damit der Veränderung des Indikators Bromthymolblau bemerkbar (Farbumschlag von blau nach gelb).

LDC - Lysindecaboxylase:

Die Lysindecaboxylase wandelt Lysin zu Cadaverin und CO₂ um. Cadaverin, ein primäres Diamin, ist eine relativ starke organische Lauge und bewirkt eine pH-Veränderung und verändert den Indikator (Bromthymolblau). Im positiven Fall kommt es über gelb zu einem Farbumschlag nach blauviolett (Bsp. \oplus = *Klebsiella pneumoniae*, \ominus = *Proteus vulgaris*).

ODC - Ornithindecaboxylase:

Ornithindecaboxylase katalysiert die Decarboxylierung von Ornithin zu Putrescin und CO₂. Putrescin ist wie Cadaverin eine organische Lauge. Die Farbreaktionen entsprechen dem LDC-Nachweis.

ADH - Arginindihydrolase:

Arginindihydrolase ist ein Enzymkomplex, der Arginin in Ornithin, CO₂ und Ammoniak spaltet. Die daraus resultierende pH-Veränderung zum Alkalischen verändert den Indikator von gelb nach blaugrün. (Bsp. ⊕ = *Enterobacter cloacae*, Ø = *Proteus vulgaris*).

DEC contr. Glu-Kontrolle:

Da alle Enterobacteriaceen Glukose spalten können, muss diese Reaktion positiv sein (gelb). Zudem dient diese Reaktion als Wachstumskontrolle und bildet bei der automatisierten Auswertung den Schwellenwert für die Berechnung der Decarboxylase-Reaktionen (LDC, ODC, ADH), sowie URE und VP. Bei der visuellen Auswertung dürfen bei negativer Reaktion (blau) diese Reaktionen nicht ausgewertet werden.

CIT - Citrat:

Natriumcitrat als einzige Kohlenstoffquelle hat die Bildung von Natriumbicarbonat zur Folge, wodurch der pH-Indikator, Bromthymolblau, von schwach lindgrün nach intensiv blaugrün umschlägt.

MAL - Malonat:

Wenn Natriummalonat als einzige Kohlenstoffquelle verwendet wird, bildet sich Natriumbicarbonat mit der entsprechenden Änderung im pH-Wert (grünblau → blau; Bsp. ⊕ = *Klebsiella pneumoniae*, Ø = *Proteus vulgaris*).

VP - Voges-Proskauer-Test:

Die Voges-Proskauer-Reaktion beruht auf dem Nachweis von Acetoin, einem von verschiedenen Bakterienarten gebildeten Kohlenhydrat-Stoffwechselprodukt, bei einer pH-Erniedrigung auf ca. 4,5. Durch Zugabe von Methylrot-Indikatorlösung kommt es im positiven Fall zu einer Rotfärbung, im negativen Fall zu einer Gelbfärbung (Bsp. ⊕ = *E.coli*, Ø = *E.cloacae*).

RHA - Rhamnose, SUC - Saccharose, ADO - Adonit, INO - Inosit, XYL - Xylose, SOR - Sorbit-

Fermentationen: Die aufgeführten Zucker werden als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. Bei ihrer Spaltung kommt es zur pH-Erniedrigung und damit zu einem Farbumschlag von blau nach gelb (Indikator: Bromthymolblau).

ONPG - o-Nitrophenylgalaktopyranosid:

Nachweis der β-Galaktosidase zur Differenzierung zwischen Laktose verzögert – und Laktose nicht spaltender Bakterien. β-Galaktosidase ist nötig, um Laktose zu spalten. Der Enzymnachweis erfolgt durch Zusatz von ONPG (Ortho-Nitro-Phenyl-β-Galactopyranosid). Dieses wird durch die β-Galaktosidase in Galaktose und o-Nitrophenol (intensiv gelb) gespalten.

Gelbfärbung < 6 h	= Laktosespaltung
Gelbfärbung > 6 h - 18 h	= verzögerte Laktosespaltung
Gelbfärbung > 24 h	= keine Laktosespaltung

ONPX - β -Xylosidase:

Das farblose Substrat o-Nitrophenylen- β -Xylosid wird durch β -Xylosidase in Xylose und o-Nitrophenol (gelb) gespalten (analoges Prinzip wie ONPG).

 β -GUR: β -Glukuronidase

Das farblose Substrat p-Nitrophenylen- β -Glukuronid wird durch β -Glukuronidase in Glukuronsäure und o-Nitrophenol (gelb) gespalten (analoges Prinzip wie ONPG).

Aufgabe 7.1.: Erregerdifferenzierung mittels biochemischer Charakterisierung

Material für 2 Studenten

- Bakterienkulturen 1,2 oder 3 auf MacConkey-Agar
- 1 steriler Tupfer
- 1 Röhrchen mit 5 ml sterilem Aqua dest.
- Cytochromoxidase-Teststreifen
- Pseudomonas-Kontrollstamm
- 1 unbeimpften Api 10 S Teststreifen

Cytochromoxidase-Test

Der Teststreifen ist mit einer 1%igen Lösung von Tetramethyl-p- Phenylendiaminhydrochlorid getränkt.

Der Test dient dem Nachweis von Cytochromen in der Atmungskette, diese ermöglichen den Eintritt von atmosphärischem Sauerstoff in den Zellstoffwechsel, in dem sie durch molekularen Sauerstoff oxidiert werden. Unter dem Einfluss bestimmter Enzyme, z.B Oxidase, werden sie wieder reduziert.
Bsp. *Pseudomonas aeruginosa* \oplus , alle Enterobacteriaceae \ominus

API 10 S ist ein standardisiertes System einer Bunten Reihe zur Identifizierung von Enterobacterales und anderer, einfacher gramnegativer Stäbchen mit Hilfe von 12 biochemischen Reaktionen.

Prinzip

Der API 10 S Streifen besteht aus 10 Mikroröhrchen, in denen sich die verschiedenen Substrate in dehydratisierter Form befinden. Die Röhrchen werden mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beimpft, welche die Substrate löst. Die biochemischen Reaktionen können anhand von Farbumschlägen abgelesen werden, die entweder spontan während der Inkubation oder nach Zugabe der Reagenzien entstehen. Die Ablesung dieser Reaktionen erfolgt mit Hilfe der Ablesetabelle. Die Identifikation erhält man entweder anhand der Prozenttabelle oder mit Hilfe des Analytischen-Profil-Indexes (siehe Auswertung im nächsten Praktikum).

Durchführung

Makromorphologie

Beschreiben Sie die auf dem Nährboden angewachsenen Kolonien.

Mikromorphologie

Fertigen Sie von einer Bakterienkolonie der MacConkey-Agarplatte ein Grampräparat an.
Beschreiben und interpretieren Sie das Ergebnis.

Biochemische Charakterisierung

- Tippen Sie mit der Öse eine Kolonie auf der MacConkey-Agarplatte an und reiben Sie das Material auf einen Cytochromoxidase-Teststreifen.
- Als Positivkontrolle reiben Sie etwas Material von einem Pseudomonasstamm auf den Teststreifen.
- Reaktionsausfall:
sofortige Blaufärbung = positiv
farblos-rosa = negativ

Stamm der Versuchskultur: _____

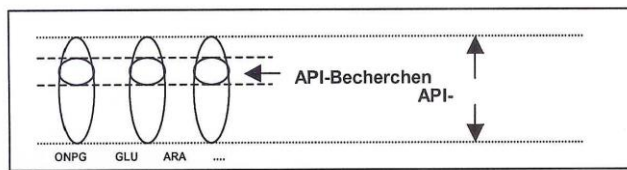
Pseudomonas-Kontrollstamm: _____

Vorbereitung des Inokulums:

- Mit einem sterilen Tupfer eine gut isolierte Kolonie vom Agar abnehmen und in 5 ml sterilem Aqua dest einrühren. Entsprechende Röhrchen stehen bereit.
- Die Bakterien im Suspensionsmedium sorgfältig homogenisieren. (Im Vergleich soll die Trübung der des **Mc-Farland-Standards von 0,5** entsprechen).
- In die Vertiefungen der Inkubationswanne ca. 2 ml Wasser mit Tropfpipette geben, Streifen in die Wanne legen.

Beimpfung des Streifens:

- Die Bakteriensuspension mit einer Pipette in die Mikroröhrchen pipettieren.
- Bei CIT das Becherchen und Röhrchen füllen.
- Für die anderen Reaktionen nur die Röhrchen füllen.
- Die unterstrichenen Reaktionen LDC, ODC, H₂S und URE hoch mit Paraffinöl überschichten.
- Die Inkubationswanne schließen und bei 35-37°C 18-24 Stunden inkubieren.



Schematische Abbildung eines Api-Streifens mit Becherchen und Röhren.

8. Charakterisierung von Streptokokken

8.1 Charakterisierung von β -hämolisierenden Streptokokken mittels Latexagglutination

Die Klassifizierung von β -hämolisierenden Streptokokken erfolgt anhand bestimmter Polysaccharid-C Antigene, die eine Einteilung in die Lancefield Gruppen erlaubt.

Das Testprinzip basiert auf Latexpartikeln, die mit spezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Lancefield-Antigen beschichtet sind. Trägt der Teststamm die dazu passenden Antigene an seiner Oberfläche, kommt es durch Bindung und Vernetzung der Latexpartikel zu einer makroskopisch sichtbaren Ausflockung.

Ergänzen Sie zunächst die Tabelle zu den wichtigsten β -hämolisierenden Streptokokken:

Lancefield-Gruppe	Vertreter	Vorkommen und hervorgerufene Erkrankungen
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>	

Materialien:

Streptokokkenstamm 1 auf ½ Columbia-Blutagarplatte

Streptokokkenstamm 2 auf ½ Columbia -Blutagarplatte

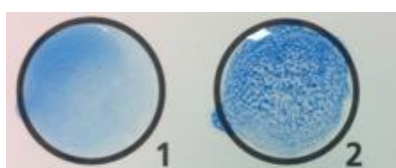
Latex-Reagenz gegen das Lancefield Gruppenantigen A

kalibrierte sterile Ösen (10 μ l)

} beide Stämme zeigen eine β - Hämolyse

Durchführung

- Geben Sie auf ein weißes Kärtchen jeweils 1 Tropfen Latex-Reagenz und reiben Sie mit einer sterilen Öse jeweils Stamm 1 und Stamm 2 ein.
- Leicht schwenken und das Auftreten einer Flockung überprüfen



Beispiel einer positiven Agglutination in Feld 2.

Auswertung

Ist es bei einem der Teststämme zu einer Agglutination gekommen?

Wenn ja, um was für einen Stamm handelt es sich dann?

Um was für einen Stamm könnte es sich handeln, wenn es NICHT zu einer Flockung kam?

Wie könnten Sie das weiter differenzieren?

8.2. Charakterisierung von Streptokokken mittels Hämolyse

Materialien:

- 1 Demonstrationsplatte mit α -, β -, γ - hämolysierenden Streptokokken
- ½ Columbia-Blutagarplatte mit Streptococcus pneumoniae mit Optochinblättchen
- ½ Columbia-Blutagarplatte mit vergrünenden Streptokokken mit Optochinblättchen
- Pneumokokken-Agglutinationsreagenz („Pneumokit“)
- kalibrierte sterile Ösen

Durchführung

Beurteilen Sie die Reinkulturen von α -und β -, hämolysierenden Streptokokken

Stamm	Beschreibung der Kolonien (Größe, Farbe, Form, Hämolyseart)
β -hämolysierende Streptokokken	
α - hämolysierende Streptokokken	

Welche Hämolyseart zeigen Pneumokokken und vergrünende Streptokokken?

Wie unterscheiden sich Pneumokokken und vergrünende Streptokokken?

Welche Infektionen können Pneumokokken und vergrünende Streptokokken verursachen?

8.3 Charakterisierung von Pneumokokken mittels Latexagglutination

Bei diesem Test handelt es sich um einen Latex-Agglutinationstest mit gleichem Prinzip wie der Streptokokken-Agglutinationstest aus Aufgabe 1.

- Geben Sie dazu auf die schwarzen Kärtchen jeweils 1 Tropfen Reagenz und reiben Sie die **vergrünenden Streptokokken** und den **Pneumokokkenstamm** ein.
- Leicht schwenken, das Auftreten einer Flockung prüfen.

Auswertung:

9.: Untersuchung der Dickdarmflora

Die Vielfalt der physiologischen Bakterienflora im Darm ist noch ausdrucksvoller als die in der Mundhöhle. Um das ganze Spektrum der vermehrungsfähigen Mikroorganismen in dieser ökologischen Nische zeigen zu können, müssten viele Stuhlverdünnungen auf mindestens 10 verschiedenen Nährböden aerob und anaerob bebrütet werden. Wir beschränken uns auf den qualitativen Nachweis einiger Arten aus der aeroben Bakterienflora.

Material

- mitgebrachte Stuhlprobe
- sterile Ösen
- 1 Leifsonagarplatte
- 1 KPC + ESBL Platte
- 1 MacConkey-Agarplatte

Durchführung

- Stuhlprobe mit der Öse auf der Leifson- und MacConkey-Agar **fraktioniert!** ausstreichen.
- Agarplatten über Nacht bei 37°C bebrüten.

Warum ist die Durchführung eines Gram-Präparates nicht sinnvoll?

.....
.....

Praktikum III

Antibakterielle Wirkung von Antibiotika

- Auswertung Aufgabe 6, Keimzahlbestimmung
- Auswertung Aufgabe 7.1, Biochemische Charakterisierung
- Auswertung Aufgabe 9, Stuhlansatz
- 10. Differenzierung von Salmonellen
- 11. Antimikrobielle Wirkung von Antibiotika
 - 11.1 Agardiffusionstest
 - 11.2 Bestimmung MHK – Makrobouillondilution

Auswertung von Aufgabe 6 vom letzten Kurs: Keimzahlbestimmung

- Tragen Sie zunächst die Zahl der Kolonien, die auf dem Nähragar angewachsen sind, in die Tabelle ein.
- Berechnen Sie dann die dazugehörigen Keimzahlen pro 1 ml Kultur.

$$\text{KBE/ml} = \text{Keimzahl/ml} = \frac{\text{Koloniezahl}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{aufgetragenes Vol. [ml]}}$$

Verdünnungsstufe	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Zahl der Kolonien				
errechnete Keimzahl/ml				

Warum muss bei Herstellung der Verdünnungsreihe die Pipettenspitze ständig gewechselt werden, aber nicht beim Auftragen auf den Agar – vorausgesetzt, Sie beginnen mit der höchsten Verdünnungsstufe?

.....

Bei welcher Keimzahl/ml liegt die untere Nachweisgrenze für die durchgeführte Methode?

.....

Auswertung von Aufgabe 7.1 vom letzten Kurs.: Biochemische Leistungsprüfung „bunte Reihe“

Ablesung des Streifens

- Lesen Sie die getesteten Reaktionen anhand ihres Farbumschlags unter Zuhilfenahme der Auswertetabelle auf der nächsten Seite ab.
- Notieren Sie alle **Spontanreaktionen** auf dem Ergebnisblatt (Beispiel s.u.).
 - alle als **POSITIV** abgelesenen Reaktionen werden mit + markiert
 - alle als **NEGATIV** abgelesenen Reaktion werden mit - markiert (s. Beispiel)

Dann folgende Reagenzien zugeben:

TDA-Test:

- 1 Tropfen TDA-Reagenz (FeCl₃-Lösung) zugeben
→ Farbumschlag nach **dunkelbraun** → **positive** Reaktion

IND-Test:

- 1 Tropfen JAMES Reagenz (p-Dimethylamino-2-Methoxybenzaldehyd) zugeben
→ unmittelbarer Farbumschlag nach **rosa** → **positive** Reaktion

OXIDASE (OX), 11. Test:

- Die Ablesung erfolgte durch Auftragen des Teststamms auf den Oxidasestreifen mit *Pseudomonas aeruginosa* als Positivkontrolle am letzten Praktikumstag

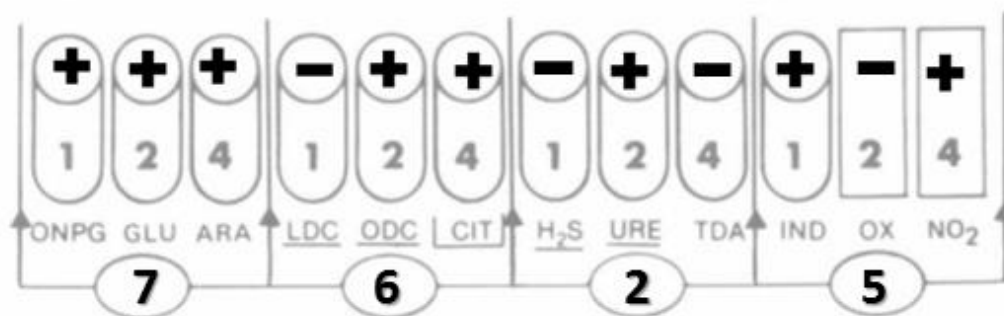
NO₂-Test, 12. Test:

- Diese Reaktion wird **NACH** Ablesen der Spontanreaktionen abgelesen:
Je einen Tropfen **NIT 1** Reagenz (Sulfanilsäure/Essigsäure) und **NIT 2** Reagenz (N,N Dimethyl-1-Naphthylamin in Essigsäure) ins **GLU**-Röhrchen geben. 2-3 Minuten warten.
→ Farbumschlag nach **rot** → **positive** Reaktion

Identifizierung durch Ermittlung des ANALYTISCHEN-PROFIL-INDEX (API):

Mit dem **ANALYTISCHEN-PROFIL-INDEX (API)**: hierbei werden alle Reaktionen in ein numerisches Profil kodiert.

Die biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt sind in 3-er Gruppen eingeteilt. Jede **positive** Reaktion erhält den Wert 1, 2 oder 4 je nach Position der Tests innerhalb der Gruppe (1., 2. oder 3. Test). Die Zahlenwerte jeder Gruppe werden addiert (negative Reaktionen = 0), somit erhält man 4 Zahlen, welche das numerische Profil darstellen.



Das Verzeichnis von Bakterienspezies mit den zugehörigen API Indices liegt am Tisch aus.
Suchen Sie in dem Heft die Zahlenkombination, die der von Ihnen ermittelten am Nächsten kommt!

Identifizierung mit der Prozenttabelle:

Die auf dem Ergebnisblatt notierten Resultate könnten alternativ mit dieser Tabelle verglichen werden. Uns dient die Tabelle mit den Wahrscheinlichkeiten eines bestimmten Reaktionsausfalls bei bestimmten Bakterienspezies auch zur Plausibilitätskontrolle der Ablesung der Reaktionsausfälle.

ABLESETABELLE

TESTS	SUBSTRATE	REAKTIONEN/ENZYME	ERGEBNISSE	
			NEGATIV	POSITIV
ONPG	Ortho-Nitro-Phenyl- β -D-Galactopyranosid	beta-Galactosidase	farblos	hellgelb (1)
GLU	Glukose	Fermentation / Oxidation (3)	blau / blau-grün	gelb / gelbgrau
ARA	Arabinose	Fermentation / Oxidation (3)	blau / blau-grün	Gelb
<u>LDC</u>	Lysin	Lysindecaboxylase	gelb	Orange
<u>ODC</u>	Ornithin	Ornithindecaboxylase	gelb	rot / orange
<u>CIT</u>	Natriumcitrat	Citratverwertung	blaßgrün / gelb	blaugrün / blau (2)
<u>H₂S</u>	Natriumthiosulfat	H ₂ S-Produkt	farblos / gräulich	schwarzer Niederschlag
<u>URE</u>	Harnstoff	Urease	gelb	rot / orange
TDA	Tryptophan	Tryptophandesaminase	<u>TDA / sofort</u>	
			Gelb	Dunkelbraun
IND	Tryptophan	Indolproduktion	<u>JAMES / sofort oder IND 2 Min.</u>	
			JAMES: farblos hellgrün / gelb IND: gelb	JAMES: rose IND: roter Ring
OX	Auf Filterpapier	Cytochromoxidase	<u>OX / 1-2 Min.</u>	
			Farblos	violett (4)
NO ₂	(GLU-Röhrchen)	NO ₂ Produktion	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 Min.	
			Gelb	Rot

(1) Eine leichte Gelbfärbung ist ebenfalls positiv.

(2) Ablesung im Becherrchen (aerober Bereich)

(3) Die Fermentation beginnt im unteren Teil des Röhrchens, die Oxidation im oberen Teil.

(4) Durchführung s.Praktikum II, Aufgabe 3

Ergebnisblatt zur Dokumentation der Reaktionsausfälle

api 10 S

REF. : _____ Patient : _____

Date : _____ Origine/ Source : _____

Dr. : _____ Service/ Dept : _____

Autres tests : _____

Other tests : _____

Identification : _____

410012 C

Prozentuale Verteilung der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins bestimmter Enzyme und Stoffwechselreaktionen bei verschiedenen Spezies

API 10 S V3.0	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	OX	NO ₂
<i>Citrobacter koseri/amalonaticus</i>	97	100	95	0	85	87	0	2	0	92	0	99
<i>Citrobacter braakii</i>	51	100	99	0	99	75	81	1	0	1	0	99
<i>Citrobacter farmeri</i>	98	100	99	0	100	0	0	0	0	100	0	99
<i>Citrobacter freundii</i>	90	100	94	0	0	75	65	1	0	1	0	98
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	99	1	99	100	1	94	0	0	99	0	99
<i>Escherichia coli</i> 1	76	95	80	98	56	1	3	4	0	70	0	99
<i>Escherichia coli</i> 2	74	99	90	0	32	1	0	2	0	50	0	98
<i>Escherichia vulneris</i>	100	99	99	15	0	0	0	4	0	0	0	99
<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	99	99	98	99	84	0	2	0	0	0	99
<i>Enterobacter amnigenus</i>	99	98	98	0	95	56	0	0	0	0	0	99
<i>Enterobacter spp/Escherichia coli/Shigella sonnei</i>	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Enterobacter cloacae</i>	99	99	99	1	93	94	0	1	0	0	0	99
<i>Hafnia alvei</i>	60	99	75	100	98	40	0	5	0	0	0	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	99	96	78	2	90	0	40	0	100	0	99
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	99	99	72	0	90	0	60	0	0	1	99
<i>Morganella morganii</i>	2	97	1	5	96	2	1	99	91	97	0	88
<i>Pantoea spp</i> 1	100	100	80	0	0	28	0	0	1	0	0	85
<i>Pantoea spp</i> 2	96	100	99	0	0	68	0	0	0	100	0	85
<i>Proteus mirabilis</i>	1	96	1	1	98	57	83	99	98	2	0	93
<i>Proteus penneri</i>	0	100	0	0	0	1	15	100	100	0	0	99
<i>Proteus vulgaris</i>	0	97	1	0	1	31	83	98	99	94	0	99
<i>Providencia rettgeri</i>	1	99	1	0	0	70	0	94	99	88	0	98
<i>Providencia stuartii/calcalifaciens</i>	1	99	2	0	0	91	0	15	100	98	0	99
<i>Salmonella arizonae</i>	97	100	99	96	97	50	96	0	0	1	0	99
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	99	0	97	97	4	70	0	0	0	1	99
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	100	100	100	1	0	33	0	0	0	0	99
<i>Salmonella paratyphi</i> A	0	100	99	0	100	0	5	0	0	0	0	99
<i>Salmonella pullorum</i>	0	100	68	75	99	0	85	0	0	0	0	99
<i>Salmonella spp</i>	4	100	94	92	95	74	85	0	0	3	0	99
<i>Salmonella typhi</i>	0	99	0	98	0	0	8	0	0	0	0	99
<i>Serratia liquefaciens</i>	94	100	98	70	99	85	0	5	0	0	0	99
<i>Serratia marcescens</i>	94	100	19	98	95	97	0	28	0	1	0	95
<i>Serratia odorifera</i>	95	99	95	97	43	87	1	0	0	99	0	99
<i>Shigella spp</i>	26	99	40	0	0	0	0	0	0	20	0	99
<i>Yersinia enterocolitica</i> 1	41	100	98	0	74	0	0	98	0	49	0	98
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2	85	97	0	0	58	0	0	99	0	0	0	98
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	77	98	29	0	0	13	0	96	0	0	0	95
<i>Aeromonas hydrophila</i>	96	98	61	50	0	50	0	0	0	85	99	98
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	95	99	0	100	100	0	0	1	0	99	99	99
<i>Vibrio alginolyticus/parahaemolyticus</i>	0	99	19	98	75	61	0	5	0	99	100	47
<i>Vibrio vulnificus/cholerae</i>	97	98	1	82	92	56	0	1	0	99	100	96
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	86	75	0	0	54	0	0	0	0	0	3
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	20	0	0	0	0	14	0	92	0	70	99	20
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	70	0	0	0	0	20	0	0	0	81	100	6
<i>Pseudomonas aeruginosa/fluorescens/putida</i>	0	30	11	0	0	68	1	15	0	0	99	14
<i>Pseudomonas spp</i>	1	7	8	0	0	54	1	4	0	0	98	48
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	6	1	0	80	83	90	1	0	0	100	96
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	96	46	17	0	0	30	0	92	0	0	96	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	60	1	0	48	0	76	1	0	0	0	4	26

Exkurs - Wissenswertes

Identifizierung heute - **MALDI-ToF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization/ Time-of-flight)**

Den Durchbruch in der schnellen und genauen ID von Mikroorganismen kam mit der Etablierung der Massenspektrometrie. Dabei wird wenig Koloniematerial auf einen Metallträger aufgetragen und mit einer speziellen Matrix überschichtet (Abb.1).

Danach löst ein gepulster Laserstrahl Moleküle als heißes Gas aus der Probe; dieser Vorgang wird Desorption genannt. Die entstehenden Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen je nach Masse in einer bestimmten Zeit auf den Detektor (Abb.2).

Die detektierten Spektren werden gegenüber einer Referenzdatenbank abgeglichen und erlauben innerhalb von 45 Minuten eine zuverlässige Identifizierung der wichtigsten humanpathogenen Pilze und Bakterien (Abb.3).

Abb. 1

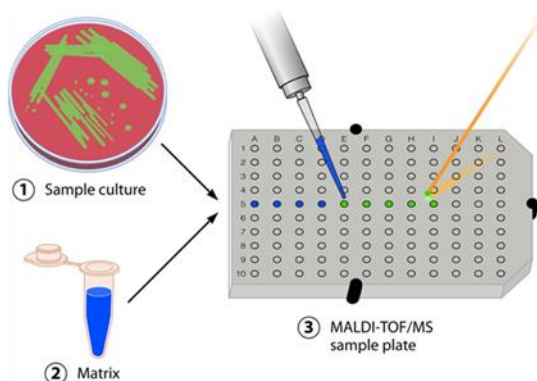


Abb. 2

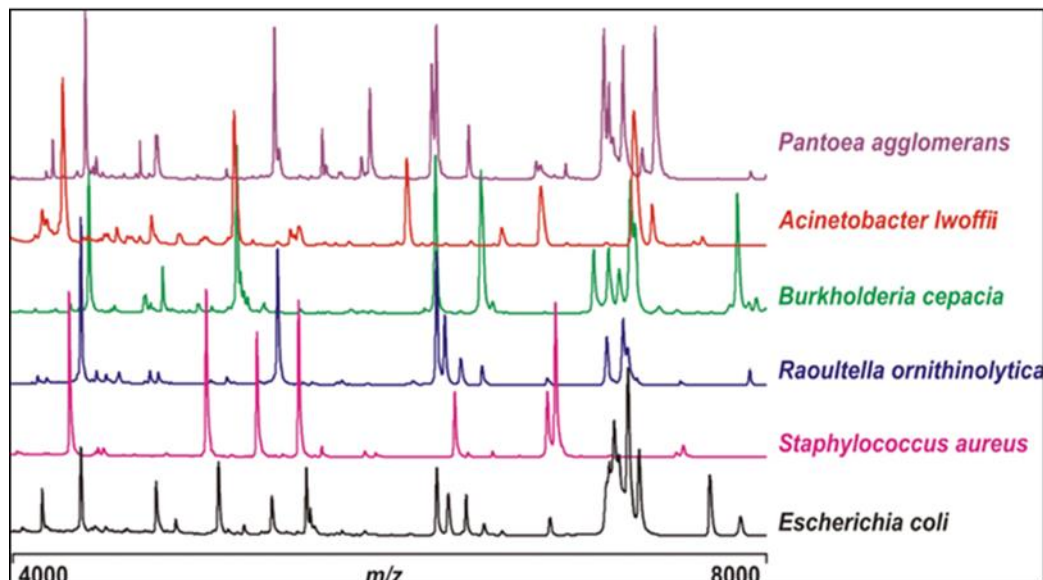
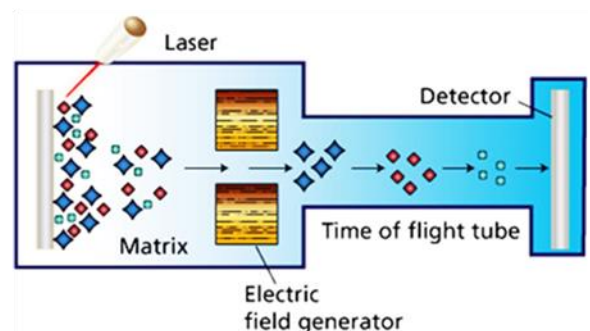
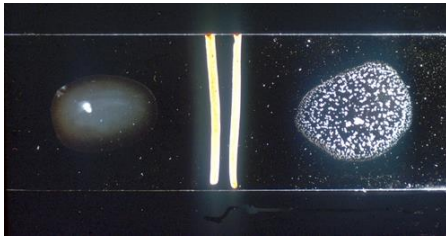


Abb. 3: Massenspektren verschiedener Bakterien im Vergleich

Durchführung

- Bringen Sie je einen Tropfen der Antiseren auf einen Objektträger (OT). Es sind auch 2 Tropfen auf 1 OT möglich.
- Reiben sie etwas Koloniematerial (ca. mohnkorngroß) gleichmäßig in die Tropfen.
- Öse zwischendurch wechseln!
- Schwenken Sie den Objektträger.
- Können Sie eine Agglutination feststellen?



Feld links: negative Reaktion
Feld rechts: Agglutination

Antiserum	Reaktionsausfall (Agglutination)	
	positiv	negativ
Salmonella polyvalent (TPE)		
Gruppenserum B		
Gruppenserum D		
Faktorens Serum O : 1		
Faktorens Serum O : 4		
Faktorens Serum O : 9		
Faktorens Serum O : 12		
Faktorens Serum vi		
Faktorens Serum H : d		
Faktorens Serum H : gm		

- Für den Salmonella-Stamm wurde folgende Antigenformel bestimmt: _____
- Vergleichen Sie mit dem White-Kauffmann-Le Minor- (Anlage 2).
- Es handelt sich folglich um den Serotyp: _____

Anlage 2		Gruppe B	
Spezies	Körper-Antigene (O)	Geißel-Antigene	
Type	Somatic (O) Antigen	Flagellar (H) Antigen	
		Phase 1	Phase 2
. S.Makoma	4, (5), 12	A	-
S.Kisangani	<u>1</u> , 4, (5), 12	a	1,2
S.Hessarek	4, 12, <u>27</u>	a	1,5
S.Fulica	4, (5), 12	a	1,5
S.Arechavaleta	4, (5), 12	a	(1,7)
S.Bispebjerg	<u>1</u> , 4, (5), 12	a	e, n, x
S.Abortus-Equi	4, 12	-	e, n, x
S.Tinda	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	a	e, n, z ₁₅
S.Nakuru	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	a	z ₆
S.Paratyphi B	<u>1</u> , 4, (5), 12	b	1,2
S.Java ¹	<u>1</u> , 4, (5), 12	b	(1,2)
S.Limete	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	1,5
S.Canada	4, 12	b	1,6
S.Uppsala	4, 12, <u>27</u>	b	1,7
. S.Sofia	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	(e, n, x)
S.Abony	<u>1</u> , 4, (5), 12	b	e, n, x
S.Abortus-Bovis	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	e, n, x
S.Wagenia	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	e, n, z ₁₅
S.Schleissheim	4, 12, <u>27</u>	b	-
S.Wien	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	l, w
S.Legon	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	c	1,5
S.Abortus-ovis	4, 12	c	1,6
S.Altendorf	4, 12, <u>27</u>	c	1,7
S.Jericho	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	c	e, n, z ₁₅
S.Bury	4, 12, <u>27</u>	c	z ₆
S.Stanley	<u>1</u> , 4, (5), 12, <u>27</u>	d	1,2
S.Eppendorf	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	1,5
S.Schwarzengrund	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	1,7
. S.Kluetjenfelde	4, 12	d	e, n, x
S.Sarajane	4, (5), 12, <u>27</u>	d	e, n, x
S.Duisburg	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z ₁₅
S.Salinatis	4, 12	d, e, h	d, e, n, z ₁₅
S.Mons	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	l, w
S.Ayinde	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	z ₆
S.Saint-Paul	<u>1</u> , 4, (5), 12	e, h	1,2
S.Reading	<u>1</u> , 4, (5), 12	e, h	1,5
. Salmonella	4, 12	e, h	1,6
S.Kaapstad	4, 12	e, h	1,7
S.Chester	<u>1</u> , 4, (5), 12	e, h	e, n, x
S.San-Diego	4, (5), 12	e, h	e, n, z ₁₅

. S.Makumira	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	e, n, x	1,7
. Salmonella	4, 12	(f), g	-
S.Derby	<u>1</u> , 4, (5), 12	f, g	(1,2)
S.Agona	<u>1</u> , 4, 12	f, g, s	-
S.Essen	4, 12	g, m	-
. S.Caledon	4, 12	g, m, t	(e, n, x)
S.Hato	4, (5), 12	g, m, s	-
S.California	4, 12,	g, m, t	-
S.Kingston	<u>1</u> , 4, (5), 12, <u>27</u>	g, s, t	(1,2)
S.Budapest	<u>1</u> , 4, 12	g, t	-
. S.Bechuana	4, 12, <u>27</u>	g, t	-
S.Travis	4, (5), 12	g, z ₅₁	1,7
S.Typhi-Murium	<u>1</u> , 4, (5), 12	i	1,2
S.Lagos	<u>1</u> , 4, 12	i	1,5
S.Agama	4, 12	i	1,6
S.Tsevie	4, 12	i	e, n, z ₁₅
S.Gloucester	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	i	l, w
S.Massena	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	k	1,5
S.Neumuenster	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	k	1,6
. Salmonella	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	k	1,6
S.Flubljana	4, 12, <u>27</u>	k	e, n, x
S.Texas	4, (5), 12	k	e, n, z ₁₅

d-Tartrat positiv gegenüber S. paratyphi B

Anlage 2

Spezies Type	Gruppe D		
	Körper-Antigene (O) Somatic (O) Antigen	Geißel-Antigene Flagellar (H) Antigen	
		Phase 1	Phase 2
S.Sendai	<u>1</u> , 9, 12	A	1,5
S.Miami	<u>1</u> , 9, 12	a	1,5
. Salmonella	9, 12	a	1,5
S.Os	9, 12	a	1,6
S.Saarbruecken	<u>1</u> , 9, 12	a	1,7
S.Loma-Linda	<u>1</u> , 9, 12	a	e, n, x
S.Durban	9, 12	a	e, n, z ₁₅
S.Onarimon	<u>1</u> , 9, 12	b	1,2
S.Frintrop	<u>1</u> , 9, 12	b	1,5
. S.Mjimwema	<u>1</u> , 9, 12	b	e, n, x
. S.Blankenese	<u>1</u> , 9, 12	b	z ₆
. S.Suederelbe	<u>1</u> , 9, 12	b	z ₃₉
S.Goeteborg	9, 12	c	1,5
S.Ipeko	9, 12	c	1,6
S.Alabama	9, 12	c	e, n, z ₁₅
S.Ridge	9, 12	c	z ₆
S.Typhi	9, 12, (Vi)	d	-
S.Ndolo	<u>1</u> , 9, 12	d	1,5
S.Tarshyne	9, 12	d	1,6
. S.Rhodesiense	<u>1</u> , 9, 12	d	e, n, x
S.Zega	9, 12	d	z ₆
S.Jaffna	<u>1</u> , 9, 12	d	z ₃₅
S.Bournemouth	9, 12	e, h	1,2
S.Eastbourne	<u>1</u> , 9, 12	e, h	1,5
S.Israel	9, 12	e, h	e, n, z ₁₅
. Salmonella	9, 12	e, n, x	1,6
. S.Lindrick	<u>1</u> , 9, 12	e, n, x	1,(5),7
S.Berta	<u>1</u> , 9, 12	f, g, (m), t	-
S.Enteritidis	<u>1</u> , 9, 12	g, m	(1,7)
S.Blegdam	9, 12	g, m, q	-
. S.Muizenberg	9, 12	g, m, s, t	1,5
. S.Kilsrivier	<u>1</u> , 9, 12	g, m, s, t	e, n, x
. S.Manica	<u>1</u> , 9, 12	g, m, s, t	z ₄₂
. S.Hamburg	<u>1</u> , 9, 12	g, m, t	-
S.Dublin	<u>1</u> , 9, 12, (Vi)	g, p	-
S.Naestved	<u>1</u> , 9, 12	g, p, s	-
S.Rostock	<u>1</u> , 9, 12	g, p, u	-
S.Moscow	9, 12	g, q	-
. S.Neasden	9, 12	g, s, t	e, n, x
S.New-Mexico	9, 12	g, z ₅₁	1,5
S.Seremban	9, 12	i	1,5

S.Claibornei	<u>1</u> , 9, 12	k	1,5
S.Goverdhan	9, 12	k	1,6
S.Mendoza	9, 12	l, v	1,2
S.Panama	<u>1</u> , 9, 12	l, v	1,5
S.Kapemba	9, 12	l, v	1,7
. Salmonella	9, 12	l, v	e, n, x
S.Goettingen	9, 12	l, v	e, n, z ₁₅
. Salmonella	9, 12	l, v	z ₃₉
S.Victoria	<u>1</u> , 9, 12	l, w	1,5
. S.Dar-Es-Salaam	<u>1</u> , 9, 12	l, w	e, n, x
S.Miyazaki	9, 12	l, z ₁₃	1,7
S.Napoli	<u>1</u> , 9, 12	l, z ₁₃	e, n, x
S.Javiana	<u>1</u> , 9, 12	l, z ₂₆	1,5
S.Pensacola	<u>1</u> , 9, 12	m, t	-
. Salmonella	9, 12	m, t	e, n, x
S.Jamaica	9, 12	r	1,5
S.Lomé	9, 12	r	z ₆
S.Lawndale	<u>1</u> , 9, 12	z	1,5
. S.Stellenbosch	<u>1</u> , 9, 12	z	1,7
. S.Angola	<u>1</u> , 9, 12	z	z ₆
. S.Hueningen	9, 12	z	z ₃₉
S.Wangata	<u>1</u> , 9, 12	z ₄ , z ₂₃	(1,7)
S.Portland	9, 12	z ₁₀	1,5
. S.Canastel	9, 12	z ₂₉	1,5
. Salmonella	<u>1</u> , 9, 12	z ₂₉	e, n, x
S.Penarth	9, 12	z ₃₅	z ₆
S.Elomrane	<u>1</u> , 9, 12	z ₃₈	-
. S.Wynberg	<u>1</u> , 9, 12	z ₃₉	1,7

11. ANTIBAKTERIELLE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA

Erstellung eines Antibiogramms

Chemotherapeutika, Antibiotika und synthetische Substanzen beeinflussen das bakterielle Wachstum in unterschiedlicher Weise. Wir wollen in einfachen Experimenten einige Reaktionsweisen kennenlernen.

11.1.: Agardiffusionstest

Das Antibiogramm hilft dem Arzt bei der Auswahl des für eine Therapie geeigneten Antibiotikums. Um exakte Ergebnisse zu erhalten, muss die Methode standardisiert sein. Das gilt für die Größe, Art und Beschickung der Testblättchen, die Zusammensetzung des Nähragars, die Schichthöhe des Nähragars und die Einsaat der Bakterien. Die Empfindlichkeit verschiedener Stämme soll untersucht werden.

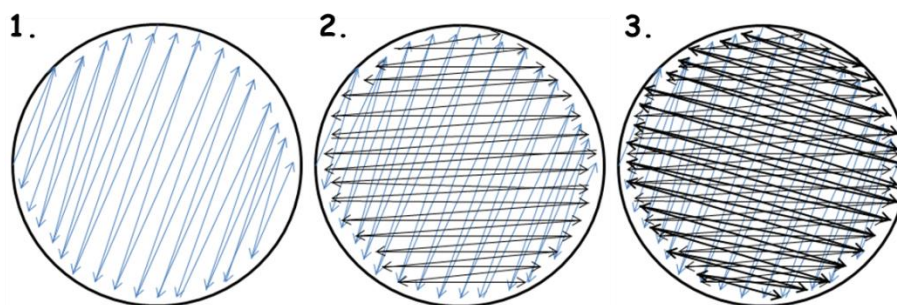
Dabei beimpfen die Studierenden die Agarplatten im Wechsel mit *E. coli* und *S. aureus*.

Material für je 2 Studenten:

- 1 Müller-Hinton--Agar-Platte
- Bakterienkulturen von *S. aureus* (Stamm: ATCC 29213) oder *E. coli* (Stamm: ATCC 25922)
- Physiologische Kochsalzlösung a 18 ml
- steriler Tupfer
- Antibiotikatestblättchen in Stempel

Durchführung

- **Bitte vermerken Sie auf der Platte, welchen Stamm Sie bearbeiten! (*E. coli* oder *S. aureus*)**
- Ihren Teststamm (*E. coli* oder *S. aureus*) in 15 ml physiol. Kochsalzlösung homogen einreiben
- dafür 1 Kolonie mit dem Tupfer abnehmen (die Trübung soll dem McFarland Standard von 0.5 entsprechen)
- Mit dem gleichen Tupfer die Bakteriensuspension **gleichmäßig dicht** auf der Testplatte ausstreichen (siehe Abbildung). **Dabei den Tupfer nur EINMAL in die Suspension eintauchen!**
- Am Tisch des Kursleiters werden über das Aufdrücken eines Stempels die Antibiotikablättchen gleichmäßig auf den Agar gebracht.
- Die Auswertung erfolgt am nächsten Kurstag.



11.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK), Makrobouillondilution

Die Testung der MHK ist eine exaktere Bestimmung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika als der Diffusionstest. **Die MHK gibt die experimentell ermittelte Konzentration eines Stoffes an, der unter definierten Bedingungen gerade in der Lage ist, ein sichtbares Wachstum der Bakterien zu verhindern.** Die MBK (minimale bakterizide Konzentration) gibt die Konzentration an, bei der die Keimzahl um 99,9 % abgesunken ist.









Es sollen MHK- und MBK-Werte Ihrer Teststämme gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt werden.

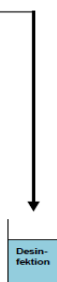
Material

- Bakterienkulturen von *E. coli* (Stamm: ATCC 25922) oder *Staph. aureus* (Stamm: ATCC 29213)
- Verwendung der NaCl-Suspensionen vom Versuch 7.1.
- Antibiotika-Stammlösung: Levofloxacin 160 mg/l
- je 8 sterile Reagenzgläser mit Müller-Hinton-Bouillon
- Eppendorfpipette
- sterile Pipettenspitzen

Durchführung

- Herstellung einer Antibiotika-Verdünnungsreihe (geometrisch).
- Dazu stehen jeweils 8 Reagenzgläser (RG) zur Verfügung.
- Im 1. RG sind bereits 1,8 ml, in den 7 übrigen RG's jeweils 1 ml Müller-Hinton-Bouillon enthalten.
- In das 1. Reagenzglas werden jetzt 0,2 ml Antibiotika-Stammlösung (**Levofloxacin 160 mg/l**)
- einpipettiert und durch schütteln gut gemischt.
- Aus dem 1. RG mittels Pipette 1 ml entnehmen und in das 2. RG geben usw., (s. Abb.) Aus dem 7. RG 1 ml entnehmen und verwerfen.
- Das 8. RG enthält kein Antibiotikum und dient als Wachstumskontrolle.
- Zugabe von jeweils 1 ml Bakteriensuspension von Versuch 11.1 in die 8 Reagenzgläser
- 18-24 Stunden bei 37°C bebrüten, Beurteilung am nächsten Kurstag (Trübung = Wachstum)

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	Röhrchen
1. Bouillon (= Vorlage)									ml
2. Antibiotika- Stammlösung (Levofloxacin)	+ 0,2	-	-	-	-	-	-	-	ml
3. Überpipettieren	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	ml
4. Antibiotika- verdünnung	—	—	—	—	—	—	—	—	µg/ml
5. Zugabe der Bakterien- suspension	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	ml
6. Endkonzentration des Antibiotikums	—	—	—	—	—	—	—	—	µg/ml



Praktikum IV

Bakterienflora aus der Umwelt

Antimikrobielle Konservierung

- Auswertung Aufgabe 11.1, Agardiffusion
- Auswertung Aufgabe 11.2, MHK – Makrobouillondilution
- 11.3 MHK-Mikromethode
- 12. Bestimmung MBK
- 13. Antimikrobielle Konservierung
- 14. Raumluftversuch, Abklatschpräparate

Auswertung Aufgabe 11.1 vom letzten Kurs.: Agardiffusionstest

Messen Sie die Hemmhofdurchmesser der einzelnen Antibiotika und werten Sie das Ergebnis aus:

- Interpretationstabelle nach European Committee on Antimicrobial
- Susceptibility Testing (EUCAST) Version 13.0 01.01.2023

für Bakterienart: *Escherichia coli*

Testsubstanz		Hemmhofdurchmesser (mm)				Ihr Ergebnis	
Bezeichnung	Konz. pro Blättchen	Sensibel ≥	I= Sensibel bei erhöhter Disposition ≤ ≥		Resi- stent <	Hemmhof- durchmesser (mm)	Bewertung
	1 unit	-			-		
P = Penicillin							
FOX = Cefoxitin	30 µg	19	-	-	19		
SXT = Trimothoprim-Sulfamethoxazol	25 µg	14	13	11	11		
IPM = Imipenem	10 µg	22	21	17	17		
LVX = Levofloxacin	5 µg	23	22	19	19		
CN = Gentamicin	10 µg	17	-	-	17		

für Bakterienart: *Staphylococcus aureus*

Testsubstanz		Hemmhofdurchmesser (mm)				Ihr Ergebnis	
Bezeichnung	Konz. pro Blättchen	Sensibel ≥	I= Sensibel bei erhöhter Disposition ≤ ≥		Resi- stent <	Hemmhof- durchmesser (mm)	Bewertung
P = Penicillin	1 unit	26			26		
FOX = Cefoxitin	30 µg	22	-	-	22		
SXT = Trimothoprim-Sulfamethoxazol	25 µg	17	16	15	14		
IPM = Imipenem	10 µg	X ¹⁾					

LVX = Levofloxacin	5 µg	50	49	22	22
CN = Gentamicin	10 µg	18			18

X¹⁾ Die Empfindlichkeit von Staphylokokken auf Imipenem leitet sich von Cefoxitin ab.

Auswertung Aufgabe 11.2 vom letzten Kurs.: Bestimmung der MHK

Lesen Sie vom Röhrchenverdünnungstest die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Levofloxacin ab und dokumentieren Sie das Ergebnis!

Röhrchen zuvor aufschütteln!

Interpretationstabelle nach EUCAST Version 13.0 vom 01.01.2024

Bakterienart	Testsubstanz	Sensibel ≤	Resistenz >
E. coli	Levofloxacin	1	2
S.aureus	Levofloxacin	1	2

Ihre getesteten Bakterienspezies:

Ihr MHK-Wert:

Ihre Bewertung:

11.3.: Bouillondilution (Mikromethode), Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Materialien für 2 Studenten:

Die MHK-Bestimmung wird in Mikrotitrationsplatten mit einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung durchgeführt. Jede Reihe der Mikrotiterplatte enthält ein Antibiotikum in geometrischer Verdünnung. Das Abkürzungsverzeichnis der Antibiotikakürzel finden Sie untenstehend.

- Die A-Platte enthält Antibiotika, die sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien wirksam sind.
- Die B-Platte enthält Antibiotika mit Wirksamkeit verstärkt oder ausschließlich gegen grampositive Keime.
- Die C-Platte enthält Substanzen mit Wirksamkeit verstärkt oder ausschließlich im gramnegativen Bereich.

Durchführung und Auswertung

- Lesen Sie den MHK-Wert ab als erste Kavität einer Spalte, in der sie makroskopisch keine Trübung als Ausdruck bakteriellen Wachstums mehr erkennen können.
- Markieren Sie die ermittelten MHK-Werte mithilfe eines Kreuzes in der vorgegebenen Tabelle.
- Die Kategorisierungen in sensibel/ intermediär/ resistent sind abhängig vom ermittelten MHK-Wert und variieren bei jedem Antibiotikum je nach Bakterienspezies.

Dabei bedeuten die Interpretationen:

- **„sensibel“(s):** Eine klinische Wirksamkeit ist bei einer Therapie mit diesem Antibiotikum zu erwarten.
- **„sensibel unter erhöhter Exposition (i)“:** Eine klinische Wirksamkeit bei Therapie mit diesem Antibiotikum könnte erzielt werden, wenn sich diese Substanz in dem zu erreichenden Kompartiment (z.B. Urin) anreichert oder die Dosierung angepasst/ erhöht wird.
- **„resistent“ (r):** Bei Therapie mit diesem Antibiotikum ist mit einem Therapieversagen zu rechnen.

Antibiotika Abkürzungsverzeichnis					
Platte A		Platte B		Platte C	
AMS	Ampicillin-Sulbactam	PEN	Penicillin	AMP	Ampicillin
PIT	Piperacillin-Tazobactam	OXA	Oxacillin	PIP	Piperacillin
CXM	Cefuroxim	Dapto	Daptomycin		
CTX	Cefotaxim	VAN	Vancomycin	CAZ	Ceftazidim
IMP	Imipenem	TPL	Teicoplanin	AZT	Aztreonam
MER	Meropenem	RAM	Rifampicin	LEV	Levofloxacin
GEN	Gentamycin	CLI	Clindamycin	TOB	Tobramycin
AMK	Amikacin	FOS	Fosfomycin	COL	Colistin
DOX	Doxycyclin	LIZ	Linezolid	TGC	Tigecycline
SXT	Trimethoprim-Sulfametoxazol	ROX	Roxitromycin	FOS	Fosfomycin
CIP	Ciprofloxacin	TGC	Tigecycline	NIT	Nitroxolin
MOX	Moxifloxacin	LEV	Levofloxacin	MECI	Mecillinam

Erreger: *E.coli* ATCC 25922

- sensibel

- sensibel unter erhöhter Exposition

- resistent

Platte A

Konzentrationen in mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIT	CXM	CTX	IMP	MER	GEN	AMK	DOX	T/S	CIP	MOX
A												
1	0,25	0,5	0,25	0,06	0,125	0,125	0,125	0,5	0,125	0,125	0,03	0,03
B												
2	0,5	1	0,5	0,125	0,25	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,06	0,06
C												
3	1	2	1	0,25	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,125	0,125
D												
4	2	4	2	0,5	1	1	1	4	1	1	0,25	0,25
E												
5	4	8	4	1	2	2	2	8	2	2	0,5	0,5
F												
6	8	16	8	2	4	4	4	16	4	4	1	1
G												
7	16	32	16	4	8	8	8	32	8	8	2	2
H												
8	32	64	32	8	16	16	500	64	GC	16	4	4

GC= growth control (Wachstumskontrolle)

Platte C

Konzentrationen in mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	PIP	CAA	CAZ	AZT	LEV	MECI	TOB	COL	TGC	FOS	NIT
A												
1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06	1	<1
B												
2	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	2	2
C												
3	1	2	1	1	1	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	4	4
D												
4	2	4	2	2	2	0,5	0,5	1	0,5	0,5	8	8
E												
5	4	8	4	4	4	1	1	2	1	1	16	16
F												
6	8	16	8	8	8	2	2	4	2	2	32	32
G												
7	16	32	16	16	16	4	4	8	4	4	64	64
H												
8	32	64	32	32	GC	8	8	16	8	8	128	>128

Erreger: *S. aureus* ATCC 29213

- sensibel

- sensibel unter erhöhter Exposition

- resistent

Platte A

Konzentrationen in mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIT	CXM	CTX	IMP	MER	GEN	AMK	DOX	T/S	CIP	MOX
A												
1	0,25	0,5	0,25	0,06	0,125	0,125	0,125	0,5	0,125	0,125	0,03	0,03
B												
2	0,5	1	0,5	0,125	0,25	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,06	0,06
C												
3	1	2	1	0,25	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,125	0,125
D												
4	2	4	2	0,5	1	1	1	4	1	1	0,25	0,25
E												
5	4	8	4	1	2	2	2	8	2	2	0,5	0,5
F												
6	8	16	8	2	4	4	4	16	4	4	1	1
G												
7	16	32	16	4	8	8	8	32	8	8	2	2
H												
8	32	64	32	8	16	16	500	64	GC	16	4	4

*Die Empfindlichkeit gegenüber den Betalaktam-Antibiotika leitet sich bei *S. aureus* von der Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin ab!

GC= growth control (Wachstumskontrolle)

Platte B

Konzentrationen in mg/l

		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	PEN	OXA	DAPTO	VAN	TPL	RAM	CLI	FOS	LIZ	ROX	TGC	LEV
A												
1	0,03	0,125	0,03	0,125	0,25	0,03	0,03	1	0,125	0,125	0,06	0,06
B												
2	0,06	0,25	0,06	0,25	0,5	0,06	0,06	2	0,25	0,25	0,125	0,125
C												
3	0,125	0,5	0,125	0,5	1	0,125	0,125	4	0,5	0,5	0,25	0,25
D												
4	0,25	1	0,25	1	2	0,25	0,25	8	1	1	0,5	0,5
E												
5	0,5	2	0,5	2	4	0,5	0,5	16	2	2	1	1
F												
6	1	4	1	4	8	1	1	32	4	4	2	2
G												
7	2	8	2	8	16	2	2	64	8	8	4	4
H												
8	4	GC	4	16	32	4	4	128	16	16	8	8

12. Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Hinweis: Sie arbeiten mit den Mikrotiterplatten aus Versuch 11.3!

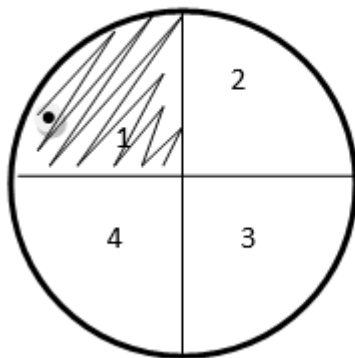
Die minimale bakterizide Konzentration ist die Konzentration eines Antibiotikums, die 99,9% der Bakterien abtötet. Zur Bestimmung der MBK wählen Sie jeweils ein bakteriostatisches und ein bakterizid wirkendes Antibiotikum (s. Tabelle) aus.

	bakterizid	bakteriostatisch
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Cefuroxim	Roxythromycin
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Piperacillin/Tazobactam	Doxycyclin

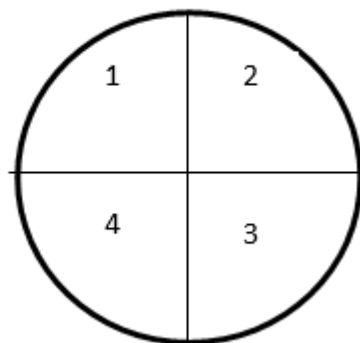
Dazu werden je 50 µl aus der MHK-Wert-Stufe (= 1. Stufe ohne Wachstum) und den nächsten 3 höheren Antibiotika-Konzentrationsstufen auf je ¼ einer Blutplatte ausplattiert. Dazu entnehmen Sie mit der gelben Pipette 50µl aus der Kavität, pipettieren diese auf eine Ecke der Blutplatte und streichen sie davon ausgehend mit einer Öse auf ¼ der Blutplatte aus. Beschriften Sie die Platten mit dem gewählten Antibiotikum und den gewählten Konzentrationsstufen.

Da das Inokulum bei der MHK-Bestimmung 1×10^5 Bakterien/ml beträgt, müsste die Keimzahl nach Bebrütung geringer als 1×10^2 KBE/ml sein, um der Forderung nach einer 99,9% Reduktion der Keimzahl zu genügen. Nach dem Einziehen der Flüssigkeit werden die Agarplatten 24 Stunden bebrütet. Erscheinen nach dem Bebrüten mehr als fünf Kolonien auf der Agarplatte, ist die entsprechende Konzentration noch nicht als bakterizide Konzentration zu bezeichnen. **Erst wenn fünf oder weniger als fünf Kolonien** auf der Agarplatte zu sehen sind, ist die **minimale bakterizide Konzentration erreicht**.

Antibiotikum bakterizid



Antibiotikum bakteriostatisch



13. Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung

Konservierungsmittel sind chemisch definierte Substanzen oder Substanzgemische, die in sehr geringen Konzentrationen Mikroorganismen abtöten oder sie in ihrer Entwicklung hemmen. Sie dienen einerseits zum Schutz eines Produkts gegenüber mikrobiellem Verderb, andererseits sollen sie aber den Patienten vor Infektionen beim Gebrauch des Produkts durch eingeschleppte Mikroorganismen schützen.

Konservierungsmittel werden sowohl in Arzneimitteln, die steril sein müssen, als auch in solchen, die nicht steril sein müssen, eingesetzt. An Arzneimittel werden bestimmte Forderungen hinsichtlich der mikrobiellen Reinheit gestellt (s. EuAB 5.1.4). Dabei werden grundsätzlich zwei Gruppen unterschieden:

- Arzneizubereitungen, die steril sein müssen und
- Arzneizubereitungen, bei denen eine begrenzte Keimzahl toleriert wird,

wobei die Begrenzung darauf hinweist, dass sich die in dem Produkt befindlichen Keime nicht weiter vermehren dürfen. In letzterem Fall wird häufig auch die Abwesenheit von bestimmten Keimen gefordert.

In der Gruppe der sterilen Zubereitungen ist der Einsatz von Konservierungsmitteln von den meisten Pharmakopöen dann zwingend vorgeschrieben, wenn Injektionszubereitungen oder Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen abgefüllt werden. Flüssige oder halbfeste Arzneimittel, für die keine Sterilität vorgeschrieben ist, unterliegen immer der Gefahr, dass einige wenige Mikroorganismen, die mit den Ausgangsstoffen eingeschleppt wurden, sich darin - trotz eines zugesetzten Konservierungsmittels - vermehren und das Produkt verderben können. Deshalb ist es erforderlich, die laufende Produktion stets stichprobenweise zu überwachen.

Der Test auf ausreichende Konservierung wird üblicherweise in der Entwicklungsphase eines neuen Arzneimittels durchgeführt. Er sollte jedoch in gewissen Zeitabständen wiederholt werden, um die Effektivität des eingesetzten Konservierungsmittels zu überprüfen. Da die Wirksamkeit von Konservierungsmitteln durch Bestandteile des Arzneimittels und durch die benutzten Behältnisse und Verschlüsse beeinflusst werden kann, sollte die Prüfung, wenn möglich, immer im Endbehältnis vorgenommen werden.

Die Anforderungen an Konservierungsmittel, die in verschiedenen Arzneimitteln zum Einsatz kommen, sind recht unterschiedlich. Am strengsten sind sie bei den Zubereitungen der Kategorie I, in der besonders hinsichtlich der Abtötungsquote von einzelnen Pharmakopöen Kurzzeitwirkungen gefordert werden, d.h. Verminderungen einer Ausgangskeimzahl von 10^6 pro ml um mindestens sechs Zehnerpotenzen in 24 h. Diese lassen sich jedoch nur in den seltensten Fällen erzielen. Das EuAB gibt Richtlinien für die Wirksamkeit von Konservierungsmitteln (s. Tabellen in 5.1.3 EuAB, s. S. 48, 49). Entsprechend der europäischen Pharmakopoe mit zwei Kategorien A und B, wobei die Kategorie A die gewünschte Anforderung darstellt und Kategorie B die mindest notwendige.

Nach dem Arzneibuch werden 10^5 bis 10^6 KBE pro ml oder g von vier bis fünf vorgeschriebenen Testorganismen in das zu prüfende Produkt (möglichst im Endbehältnis) homogen eingemischt und die Anzahl der überlebenden Keime nach bestimmten Zeiten, in der Regel nach 1, 7, 14 Tagen, bestimmt. Die konservierenden Eigenschaften der Zubereitung sind ausreichend, wenn unter den Bedingungen der Prüfung eine Verminderung der Keimzahl (s. Tabellen in 5.1.3 EuAB) der entsprechenden Mikroorganismen in der beimpften Zubereitung eintritt.

Im Rahmen des Praktikums sollen Arzneimittel der Kategorie I (Augentropfenpräparate in Mehrdosenbehältnissen) auf ausreichende Konservierung überprüft werden. Dabei sollen die Studierenden zu **vier** 1x Augentropfen mit und 1x ohne Konservierungsmittel bearbeiten.

Material

Mikroorganismen:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>	Als fertige Keimsuspension
------------------	--	----------------------------

Sonstiges:

- 5 ml Augentropfen im Originalbehälter / Konservierungsmittel Benzalkonium Chloridlösung 0,1%
- 5 ml Kontrolllösung ohne Konservierungsmittel
- NaCl-Röhrchen a 2,7 ml
- Mueller-Hinton-Platten für Bakterien
- Sabouraud-Agarplatten (Agarmedium C nach EuAB) für Pilze
- sterile Ösen
- Pipetten und sterile Pipettenspitzen

Durchführung

a) Die Suspensionen der Bakterien und Pilze sind bereits durch Trübungsvergleich mit einem Standard (McFarland-Standard 0,5) auf eine Keimzahl von $1,5 \times 10^8$ KBE/ml (Bakterien) und 5×10^7 KBE/ml (Pilze) eingestellt.

b) Beimpfung:

- Sie arbeiten zu zweit.
- Beimpfen Sie bitte ein Fläschchen eines Augentropfenpräparates mit oder ohne Konservierungsmittel mit einer Suspension der vorbereiteten Testorganismen (siehe EuAB 5.1.3), so dass eine Keimdichte von 5×10^5 Mikroorganismen je ml der Zubereitung entsteht.
- Das zur Beimpfung benutzte Volumen sollte 1 % des Volumens der Zubereitung nicht überschreiten.

Bitte Flaschen mit Platznummer und Keimart beschriften!

zu beimpfendes Volumen:

zuzusetzendes Volumen:

KbE/ml der Suspension:

KbE/ml des Präparates:

Nach dem Beimpfen wird kurz gemischt und **sofort** werden 0,3 ml für die **Probe t=0** entnommen und die Keimzahl je ml des Inhaltes von jedem Behältnis bestimmt.

c) Keimzahlbestimmung:

Siehe Aufgabe 6

- Nach dem Erstellen der gesamten Verdünnungsreihe ($10^1 - 10^7$) (siehe Versuch 5: Keimzahlbestimmung) werden jeweils 10 µl (mit einer Plastiköse) der Verdünnungen $10^0 - 10^7$ auf je 1/4 einer Mueller-Hinton-Platte (für Bakterien) bzw. Sabouraud-Platte (für Pilze) aufgetragen.

- Dabei kann man mit einer sterilen Öse auskommen, wenn man mit der höchsten Verdünnung (10^7) beginnt und schrittweise bis zur niedrigsten Verdünnung (10^0) aufrägt und die Probe gleichmäßig auf 1/4 der Agaroberfläche verteilt.
- Nachdem die Flüssigkeit in den Agar eingezogen ist, werden alle Agarplatten mit Bakterien 24 h bei 37°C bebrütet, solche mit Pilzen 48 h bei 20 bis 25°C, d.h. bei Raumtemperatur.
- Nachdem Sie die Keimzahlbestimmung technisch durchgeführt haben und die Agarplatten bebrütet sind, können Sie die Keimzahl (Zahl der koloniebildenden Einheiten, KBE) bestimmen.
- Weitere Proben werden nach **3 h, 24 h, 7 Tagen, 21 Tagen** entnommen und in gleicher Weise bearbeitet.

PRÜFUNG AUF AUSREICHENDE ANTIMIKROBIELLE KONSERVIERUNG

5.1.3 Prüfung auf ausreichende Konservierung

Falls eine pharmazeutische Zubereitung nicht selbst schon ausreichend antimikrobielle Eigenschaften besitzt, können insbesondere zu wäßrigen Zubereitungen Konservierungsmittel zugesetzt werden. Diese Maßnahme hat den Zweck, eine Vermehrung von Mikroorganismen zu verhindern oder die Auswirkung einer mikrobiellen Kontamination einzuschränken, die unter den normalen Bedingungen der Lagerung sowie des Gebrauchs insbesondere von Mehrdosenbehältnissen auftreten könnten. Durch sie soll eine Gefährdung des Patienten vermieden werden, die sich aus einer Infektion oder einer Veränderung der Zubereitung ergeben könnte. Die Zugabe von Konservierungsmitteln darf nicht als Ersatz für eine Herstellung entsprechend guter pharmazeutischer Praxis dienen.

Die Wirksamkeit von Konservierungsmitteln kann durch den Wirkstoff der Zubereitung, durch die Art der Formulierung der Zubereitung oder auch durch die benutzten Behältnisse und Verschlüsse vergrößert oder verringert werden. Um sicherzustellen, daß die antimikrobielle Wirksamkeit der Zubereitung nicht durch die Lagerung beeinträchtigt wird, soll die Wirksamkeit im Endbehältnis über einen Zeitraum geprüft werden, der der Haltbarkeitsdauer der Zubereitung entspricht. Die Untersuchungen können an Proben vorgenommen werden, die den Endbehältnissen unmittelbar vor der Prüfung entnommen wurden.

Während der Entwicklung einer Zubereitung muß nachgewiesen werden, daß die antimikrobielle Wirkung der Zubereitung als solche bzw. mit dem erforderlichen Zusatz eines geeigneten Konservierungsmittels oder geeigneter Konservierungsmittel einen ausreichenden Schutz vor Beeinträchtigungen gewährt, die sich aus einer mikrobiellen Kontamination oder einer Vermehrung von Mikroorganismen während der Lagerung und des Gebrauchs der Zubereitung ergeben können.

Die Wirksamkeit der Konservierung kann mit der nachstehenden Prüfung nachgewiesen werden. Die Prüfung ist nicht für die Routinekontrolle gedacht.

Durchführung der Prüfung

Die Prüfung besteht aus der Kontamination der Zubereitung, wenn möglich in ihrem Endbehältnis, mit einem vorgeschriebenen Inokulum geeigneter Mikroorganismen, der Lagerung der beimpften Zubereitung bei einer bestimmten Temperatur, der Entnahme von Proben aus dem Behältnis in bestimmten Zeitabständen und der Bestimmung der Anzahl der Mikroorganismen in den so entnommenen Proben.

Die konservierenden Eigenschaften der Zubereitung sind ausreichend, wenn sich unter den Bedingungen der Prüfung eine eindeutige Verminderung oder gegebenenfalls keine Vermehrung der Keimzahl in den beimpften Zubereitungen nach den vorgeschriebenen Zeiten bei den vorgeschriebenen Temperaturen ergibt. Die Kriterien für die Annahme, ausgedrückt als Verminderung der Keimzahl innerhalb einer bestimmten Zeit, unterscheiden sich nach der Art der Zubereitung und dem Ausmaß der beabsichtigten Konservierung (siehe Tabellen 1 bis 3).

Testorganismen

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118
Staphylococcus aureus ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83
Candida albicans ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72
Aspergillus niger ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83.

Die Stämme werden jeweils einzeln verwendet, wobei die vorgesehenen Mikroorganismen gegebenenfalls durch andere Stämme oder Arten ergänzt werden, die mögliche Kontaminationskeime der Zubereitung sein können. Beispielsweise wird *Escherichia coli* (ATCC 8739; NCIMB 8545; CIP 53.126) für alle oralen Zubereitungen und *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92) für alle oralen Zubereitungen, die einen hohen Zuckergehalt besitzen, empfohlen.

Herstellung des Inokulums

Zur Herstellung des Inokulums wird bei Bakterien die Oberfläche von Agar-Medium B (2.6.12), bei Pilzen die Oberfläche von Agar-Medium C ohne Antibiotika-Zusatz (2.6.12) mit einer frischen Anzucht der Stammkultur der entsprechenden Mikroorganismen beimpft. Die Bakterienkulturen werden 18 bis 24 h lang bei 30 bis 35 °C, die Kultur von *C. albicans* 48 h lang bei 20 bis 25 °C und die Kultur von *A. niger* 1 Woche lang oder bis zur ausreichenden Sporulation bei 20 bis 25 °C bebrütet. Es kann erforderlich sein, nach der Wiederbelegung der Keime Subkulturen anzulegen, ehe sich die Keime im optimalen Zustand befinden, doch sollte die Anzahl der Subkulturen auf ein Minimum beschränkt bleiben.

Um die Bakterien- bzw. *C. albicans*-Kulturen zu ernten, werden die auf der Oberfläche gewachsenen Keime mit einer sterilen Lösung, die 9 g · l⁻¹ Natriumchlorid R und 1 g · l⁻¹ Pepton R enthält, in ein geeignetes Gefäß abgeschwemmt. Der Keimgehalt der Suspension wird durch Zugabe der gleichen Lösung auf etwa 10⁸ Mikroorganismen je Milliliter eingestellt. Die Kultur von *A. niger* wird mit einer sterilen Lösung, die 9 g · l⁻¹ Natriumchlorid R und 0,5 g · l⁻¹ Polysorbat 80 R enthält, abgeschwemmt und mit der gleichen Lösung auf einen Sporengleich von etwa 10⁸ je Milliliter eingestellt.

Unmittelbar danach wird von jeder der Suspensionen eine Probe genommen und deren Gehalt an koloniebildenden Einheiten (KBE) je Milliliter mit Hilfe der Methode der Membranfiltration oder Zählung auf Agarplatten (2.6.12) bestimmt. Dieser Wert dient zur Ermittlung der Größe des Inokulums und des für die Prüfung zu verwendenden Bezugswerts. Die Suspensionen sollten unverzüglich verwendet werden.

Methode

Zur Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der beimpften Zubereitung werden für die betreffenden Mikroorganismen die gleichen Agar-Nährmedien benutzt wie bei der Herstellung der Inokula.

Eine entsprechende Anzahl von Behältnissen, die die zu prüfende Zubereitung enthalten, wird mit einer Suspension der angegebenen Testorganismen jeweils so beimpft, daß eine Keimdichte von 10² bis 10⁶ Mikroorganismen je Milliliter oder Gramm der Zubereitung entsteht. Das zur Beimpfung verwendete Volumen darf

1 Prozent des Volumens der Zubereitung nicht überschreiten. Um eine homogene Verteilung zu erhalten, wird sorgfältig gemischt.

Die beimpfte Zubereitung wird unter Lichtschutz bei 20 bis 25 °C gelagert. Zu Beginn der Prüfung und nach Intervallen entsprechend der Art der Zubereitung wird eine dem Zweck entsprechende Probe aus der beimpften Zubereitung, üblicherweise 1 Milliliter oder 1 Gramm, entnommen und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten mit Hilfe der Agarplatten- oder Membranfiltrationsmethode (2.6.12) bestimmt. Dabei muß sichergestellt werden, daß jegliche verbleibende antimikrobielle Wirkung der Zubereitung durch Verdünnung, Filtration oder durch spezifische Inaktivierung ausgeschaltet wird. Falls mit Verdünnungen gearbeitet wird, muß die verminderte Empfindlichkeit beim Nachweis kleiner Zahlen lebensfähiger Mikroorganismen berücksichtigt werden. Bei der Verwendung eines spezifischen Inaktivators muß durch geeignete Kontrollen bestätigt werden, daß das System das Wachstum der Testorganismen erlaubt.

Durch Validierung muß nachgewiesen sein, daß das Verfahren geeignet ist, die erforderliche Minderung der Keimzahl festzustellen.

Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit

Die Tabellen 1 bis 3 enthalten die Kriterien zur Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit; als Maß dient die Verminderung der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen, bezogen auf den Keimgehalt des Inokulums.

Tabelle 1: Parenteralia und Ophthalmika

		Keimzahlminderung					
	Kriterium	6 h	24 h	7 d	14 d	28 d	
Bakterien	A	10^{-2}	10^{-3}	–	–	vermehrungsfähige Keime nicht nachweisbar	
	B	–	10^{-1}	10^{-3}	–	keine Zunahme der Keimzahl	
Pilze	A	–	–	10^{-2}	–	keine Zunahme der Keimzahl	
	B	–	–	–	10^{-1}	keine Zunahme der Keimzahl	

Tabelle 2: Zubereitungen zur topischen Anwendung

		Keimzahlminderung				
	Kriterium	2 d	7 d	14 d	28 d	
Bakterien	A	10^{-2}	10^{-3}	–	keine Zunahme der Keimzahl	
	B	–	–	10^{-3}	keine Zunahme der Keimzahl	
Pilze	A	–	–	10^{-2}	keine Zunahme der Keimzahl	
	B	–	–	10^{-1}	keine Zunahme der Keimzahl	

Das Kriterium A stellt die empfohlene Wirksamkeit dar. In begründeten Fällen, in denen das Kriterium A nicht erfüllt werden kann, zum Beispiel bei einem erhöhten Risiko von Nebenwirkungen, muß das Kriterium B erfüllt werden.

Tabelle 3: Zubereitungen zur oralen Anwendung

		Keimzahlminderung	
		14 d	28 d
Bakterien	10^{-3}	keine Zunahme der Keimzahl	
Pilze	10^{-1}	keine Zunahme der Keimzahl	

Die angegebenen Kriterien stellen die empfohlene Wirksamkeit dar.

DIE BAKTERIENFLORA DES MENSCHEN UND SEINER UMWELT

Die Verunreinigung pharmazeutischer Präparate erfolgt weitgehend durch die Flora des Menschen und seiner Umgebung, wobei verschiedene ökologische Nischen eine besondere Rolle spielen. In den folgenden Teilen wollen wir solche Bereiche kennenlernen.

14 Hygienische Untersuchungen am Arbeitsplatz – Raumluftuntersuchung/ Abklatschplatten

Es gibt zahlreiche verschiedene Methoden zur hygienischen Untersuchung auf das Vorkommen vermehrungsfähiger Mikroorganismen. Wir wollen nur einige weniger aufwendige Methoden benutzen, die einen Aufschluss über die mikrobielle Besiedlung am Arbeitsplatz zulassen.

Durchführung

- Zur Untersuchung der Luft lassen wir 3 Stunden lang am Arbeitsplatz eine geöffnete Petrischale mit Blutagar sowie eine Sabouraud-Platte, ebenfalls geöffnet, stehen, die anschließend 24 Stunden bei 37°C und dann zwei Tage bei Raumtemperatur (Sabouraud-Platte 1 Woche) bebrütet wird.
- Außerdem wird ein Abklatsch-Präparat, z. B. vom Fußboden oder Kittel, untersucht.
- Abklatsch-Platten mit Nähragar werden mit der Agarschicht auf die zu untersuchende Stelle gedrückt, nach wenigen Sekunden wieder abgehoben und geschlossen.
 - Die Platten werden 24 Stunden bei 37°C und danach bis zum nächsten Kurstag bei Raumtemperatur bebrütet.

Praktikum V

Serologische Verfahren

- Auswertung Aufgabe 12, MBK
- Auswertung Aufgabe 13, Augentropfenversuch 0h,3h,24h
- Auswertung Aufgabe 14, Raumluftuntersuchung/Abklatschplatten
- 15. Augentropfenversuch nach 7d

- Serologie:
- 16. TPHA-Test
- 17. Ouchterlony (Demo)
- Tetanus Elisa (Demo)

Auswertung Aufgabe 12 vom letzten Kurs.: Minimale bakterizide Konzentration

Bitte geben Sie das Ergebnis in der folgenden Tabelle an:

	Antibiotikum	AB-Konzentration (mg/ml)				Zahl der Kolonien				MRK (mg/ml)	
Erreger											
		1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.		
		Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung	Vertiefung		
Staph. aureus ATCC 29213	Cefuroxim										
	Roxythromycin										
E. coli ATCC 25922	Piperacillin / Tazobactam										
	Doxycyclin										

Auswertung Aufgabe 13: Antimikrobielle Konservierung

Präparat:

Konservierung:

Von allen Proben werden die Keimzahlen/ml (Mittelwert) ermittelt und anschließend der dekadische Logarithmus dieser Zahl gegen die Zeit graphisch aufgetragen.

Konservierte Lösung:

Keim	Verdünnungs-Stufe	0 h		3 h		24 h		7 Tage		14 Tage	
		n	log	n	Log	n	log	n	log	n	Log
	10^0										
	10^{-1}										
	10^{-2}										
	10^{-3}										
	10^{-4}										
	10^{-5}										
	10^{-6}										
	10^{-7}										
KBE / ml											

Nicht konservierte Lösung:

Keim	Verdünnungs-Stufe	0 h		3 h		24 h		7 Tage		14 Tage	
		n	log	n	Log	n	log	n	log	n	Log
	10^0										
	10^{-1}										
	10^{-2}										
	10^{-3}										
	10^{-4}										
	10^{-5}										
	10^{-6}										
	10^{-7}										
KBE / ml											

Tragen Sie in die Tabelle die ausgezählten Kolonien, errechnen Sie die Kbe/ml als Mittelwert und den dazugehörigen Logarithmus.

Beurteilen Sie das Ergebnis auch im Zusammenhang mit den im Arzneibuch angegebenen Richtlinien zur Bewertung der Wirksamkeit der Konservierung (s. Tabellen in 5.1.3 EuAB).

Beurteilung der Probe:

Auswertung Aufgabe 14: Raumlufversuch und Abklatschpräparate

Beschreiben Sie die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Zahl der Kolonien ihrer charakteristischen Merkmale.

1. Raumluf:

Blutagar	Sabouraud-Agar

2. Abklatschpräparate:

15.: Augentropfen-Keimzahlbestimmung nach 14 Tagen

Siehe Aufgabe 6 Seite 26

SEROLOGISCHE VERFAHREN

In der Serologie werden Antigen-Antikörper-Reaktionen in zweierlei Hinsicht verwandt. Einmal zum Antikörper-Nachweis im Serum (z. B. Patienten-Serum) und zum anderen zum Nachweis unbekannter Antigene (z. B. in Serum und anderen Körperflüssigkeiten). Das Serum ist der flüssige Bestandteil des Blutes, aus dem der Blutgerinnungsstoff Fibrinogen entfernt wurde. Es enthält keine Zellen (Blutkörperchen) und besteht aus Wasser und darin gelösten Proteinen (Enzyme, Immunglobuline), Hormonen, Fetten, Zuckern, Salzen u.v.m.

16 Nachweis von Antikörpern im Patientenserum mittels Agglutinationsreaktion

Syphilisdiagnostik: *Treponema pallidum*-Hämagglutinations-Agglutinations-Testes (TPHA)

Material

- mit Antigen von *T. pallidum* sensibilisierte Erythrozyten, gebrauchsfertig (**Ery⁺**)
- unsensibilisierte Erythrozyten, gebrauchsfertig (**Ery⁻**)
- Verdünnungsmittel, gebrauchsfertig (**Puffer**)
- positives Kontrollserum, 1:20 vorverdünnt (**PKS**)
- negatives Kontrollserum, 1:20 vorverdünnt (**NKS**)
- Patientenserumprobe (**SER**)

- Eppendorfpipetten
- Mikrotitrationsplatte (U-Strips)

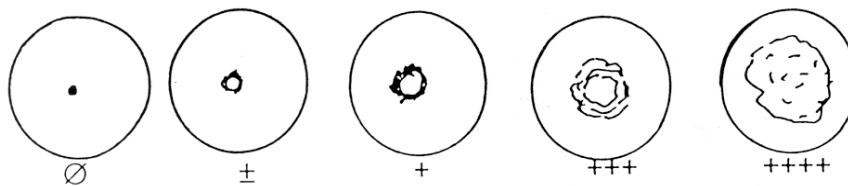
Durchführung

Pipettierschema

	Positive Kontrolle mit PKS	Negative Kontrolle mit NKS	Patientenuntersuchung mit SER
A	-	-	100 µl Puffer } 25 µl SER (Verdünnung 1:5)
B	-	-	75 µl Puffer } 25 µl (A) (Verdünnung 1:2)
C	25 µl PKS 75 µl Ery⁺ (Verdünnung 1:80; Kontrolle +Reaktion)	25 µl NKS 75 µl Ery⁺ (Verdünnung 1:80; Kontrolle -Reaktion)	25 µl (B) 75 µl Ery⁺ (Verdünnung 1:80; eigentlicher Test)
D	25 µl PKS 75 µl Ery⁻ (Verdünnung 1:80; Kontrolle unspezifischer Hämagglutination)	25 µl NKS 75 µl Ery⁻ (Verdünnung 1:80; Kontrolle unspezifischer Hämagglutination)	25 µl (B) 75 µl Ery⁻ (Verdünnung 1:80; Kontrolle unspezifischer Hämagglutination)

- Platten kurz schütteln, - 45 - 60 Min. bei Raumtemperatur inkubieren

Auswertung:



17.: Immundiffusion im Agargel nach Ouchterlony (Demo)

Bei der Doppeldiffusionstechnik **diffundieren Antigen und Antikörper im Agargel aufeinander zu**. An der Stelle zwischen den beiden Auftragsstellen, an der sich ein **optimales Verhältnis zwischen Antigenen und Antikörpern** aufgebaut hat, entsteht eine **Präzipitationslinie**.

Ein Anti-Human-Serum (Serum einer Ziege, die Antikörper gegen humane Serumproteine gebildet hat) soll in der Ouchterlony-Technik gegen verschiedene Konzentrationen eines Humanserums (Antigene) mit Hilfe der Immundiffusion ausgetestet werden.

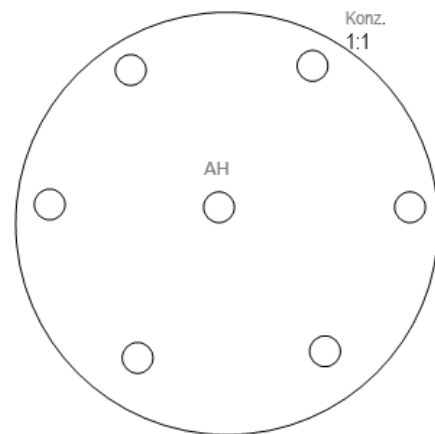
Durchführung

- Mit Hilfe einer Pipette wird das mittlere Loch der Agardiffusionsplatte mit konzentriertem Antihumanserum (20µl), die peripheren Löcher werden mit der Verdünnungsreihe des Humanserums beschickt (je 10µl).

Material (für 2 Studenten)

- 1 Agar-Diffusionsplatte nach Ouchterlony (die Platten sind zur Demo für Sie bereits vorbereitet)

- Zeichnen Sie schematisch das Ergebnis:



Diskutieren und beurteilen Sie das Ergebnis.

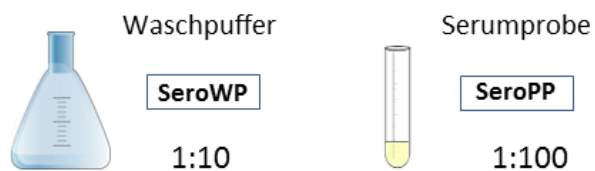
18.: Diphtherie Elisa, Westernblot

Testprinzip Diphtherie-Elisa

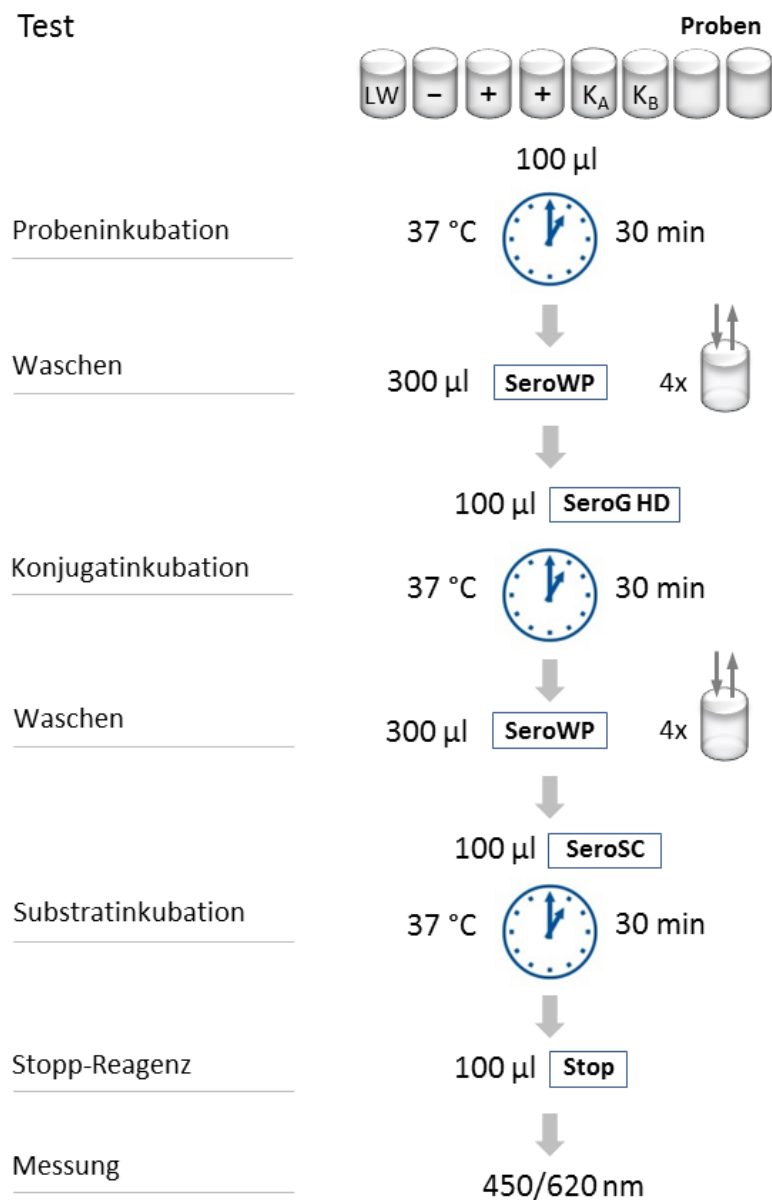
RIDASCREEN® Diphtherie IgG ist ein Zweischnitt-ELISA nach dem Sandwich-Prinzip. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Diphtherie-Toxoid beschichtet. In Patientenproben vorhandene Antikörper binden an das Antigen und werden in einem zweiten Schritt mit Enzym-markierten Anti-human-Antikörpern (Konjugat) nachgewiesen. Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen.

Durchführung:

Vorbereitung



Test



Die Ergebnisse werden photometrisch gemessen.

Beurteilung der Messwerte:

IU/ml	empfohlene Impfung
< 0,1	Grundimmunisierung
0,1 – 0,9	Auffrischimpfung
1,0 – 1,4	Auffrischimpfung nach 5 Jahren
1,5 – 2,0	Auffrischimpfung nach 7 Jahren
> 2,0	Auffrischimpfung nach 10 Jahren

Beispiel Westernblot-Auswertung Borrelien Antikörper

Nr. Probe Sample	recomLine Borrelia IgG recomLine Borrelia IgM Art-Nr. A11 Nr. 4272 / 4273 / 4276 / 4277	IgG IgM	Antigenbanden Antigen bands Theoretischer B. garini Opa Typ 4 = B. garini 1														Beurteilung Interpretation	
			p100 VlsE p58 p41 p39 OspA OspC p18															
1	206491	X	1	+													6.2	Negativ negative
2	3267	X	2														10	Negativ negative
3	15	X	3														10	Negativ negative
4	15	X	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	Positiv positive
5	15	X	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	Positiv positive
6	15	X	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	Positiv positive
7	15	X	7														10	Negativ negative
8	15	X	8														10	Negativ negative
9	15	X	9														10	Negativ negative
10	206491	X	10														10	Negativ negative
11	3267	X	11														10	Negativ negative
12	15	X	12														10	Negativ negative
13	15	X	13														10	Negativ negative
14	15	X	14														10	Negativ negative
15	15	X	15														10	Negativ negative
16	15	X	16														10	Negativ negative
17	15	X	17														10	Negativ negative

Praktikum VI

Pharmazeutisch mikrobiologische Versuche

- Auswertung Aufgabe 15, Augentropfenversuch nach 7d
- 19. Augentropfenversuch nach 21d
- 20. Bakterizide Wirkung von UV- Licht
- 21. Absterbevorgang einer Kultur
- 22. Konzentrationsbestimmung von Antibiotika

Auswertung Aufgabe 15 vom letzten Kurs, Augentropfen nach 7 Tagen

Siehe Seite 61, Aufgabe 13

19.: Augentropfen-Keimzahlbestimmung nach 21 Tagen

Siehe Aufgabe 6 Seite 26

20.: Die bakterizide Wirkung von UV-Licht

UV-Strahlen (Wellenlänge zwischen 10 und 400 nm) haben einen bakteriziden Effekt. Obwohl die molekulare Wirkungsweise von UV-Strahlen auf Zellen noch nicht eindeutig geklärt ist, sprechen einige Befunde für einen direkten Effekt auf die Nukleinsäuren:

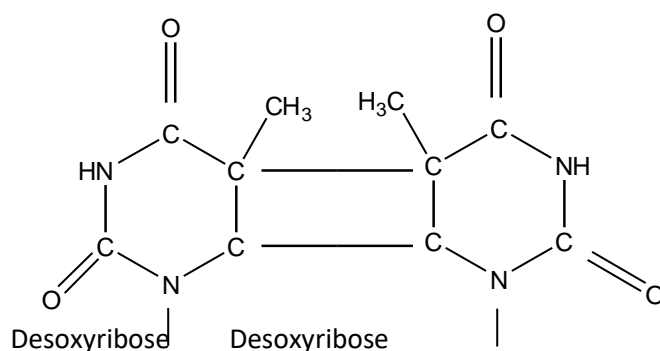
Das Absorptionsmaximum von Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Lösung fällt mit dem Maximum der bakteriziden Wirkung von UV-Strahlen bei 260 nm zusammen.

Durch Bestrahlung von Nukleinsäuren in Lösung mit UV-Licht wird die Doppelbindung zwischen C5 und

C6 von Pyrimidinringen der Basen Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U) aktiviert. Bei Cytosin und Uracil

kann als Reaktionspartner H₂O auftreten: Es resultiert eine 6-Hydroxy-dihydro-Verbindung. Nach Absetzen der UV-Bestrahlung ist diese photochemische Wasseraddition reversibel.

Für alle drei Basen kann aber auch eine in der gleichen oder der komplementären Kette direkt benachbart liegende Pyrimidinbase (C, T, U) als Reaktionspartner in Frage kommen: In einer nicht reversiblen Reaktion wird dabei über die beiden angeregten C5-C6-Doppelbindungen ein stabiles Cyclobutanderivat gebildet.



Derartige Produkte konnten inzwischen auch in DNS nachgewiesen werden, die aus UV-bestrahlten Bakterien isoliert wurde. Andere DNS-schädigende Noxen sind z. B. oxidierende Substanzen (H₂O₂), die z. B. auch unter Einwirkung von UV-Licht im Wasser entstehen und somit einen indirekten UV-Effekt auf die Zellen darstellen.

Mit der Dimerisierung haben die Basen ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu dem komplementären Strang verloren. Infolgedessen kommt der

Enzymkomplex, der für die identische Verdopplung des DNS-Doppelstrangs verantwortlich ist (Replisom), an dieser Stelle zum Stop. Dieser Stop wiederum löst sekundäre Reaktionen aus, die zum Zelltod führen (vgl. Referenz 1).

Bakterien verfügen jedoch über mehrere Möglichkeiten zur Reparatur solcher DNS-Schäden:

- **Photo-Reaktivierung:** Diese erfolgt durch ein Enzym, die Photolyase, das einen Chromophor trägt, der Licht im sichtbaren UV-Licht (350 - 420 nm) absorbiert und diese Energie zur Spaltung des Cyclobutanringes benutzt.
- **Enzymatische (Dunkel) Reaktivierung:** Hierbei wird eine Zucker-Phosphatbindung in der Nähe des Dimers durch ein Enzym (Endonuklease) gespalten und ein Teil des defekten Stranges einschließlich des Dimers durch ein anderes Enzym enzymatisch abgebaut (Exonuklease). Nachfolgend dient der nicht gespaltene, unveränderte Strang als Matrice für die Neusynthese des abgebauten Teils im Komplementärstrang durch eine DNS-Polymerase.
- **Rekombinatorische Reparatur:** Diese Reparatur findet direkt im Anschluss an eine Replikation des Chromosomes statt. Dabei wird der intakte neu synthetisierte Strang benutzt, um die Lücke zu füllen, die nach der Replikation im zweiten Strang gegenüber einer nicht-reparierten Schadstelle zurückbleibt.

Wellenlänge und Intensität der UV-Bestrahlung bestimmen die Anzahl der DNS-Schäden im Chromosom. Die Aktivität der Reparaturenzyme bestimmt dagegen, wieviele Schäden repariert werden können. UV-Licht hat neben einer direkten Aktivierung des an der Photo-Reaktivierung beteiligten Enzymsystems auch eine indirekte Wirkung. Diese umfaßt die Steigerung der Neusynthese (= Induktion) verschiedener SOS-Reparaturenzyme, vermittelt durch das RecA-Genprodukt (vgl. **Referenz 2**). Bereits **ein** nicht reparierter Defekt genügt, um den Tod einer Zelle einzuleiten, wenn auch die Stoffwechselleistungen noch für eine gewisse Zeit aufrechterhalten werden können.

Die Eindringtiefe von UV-Strahlen in feste oder flüssige Körper ist sehr gering (0,01 - 0,2 mm). Daher sind sowohl Organismen in Verbindung mit organischen Verbindungen oder in Flüssigkeiten als auch Organismen in der Luft, die von Staub umgeben sind, weit weniger empfindlich für UV-Strahlen als ungeschützte Organismen.

Material

- Übernacht-Bouillonkulturen der Stämme:
 - o *Escherichia coli* W3110 (*recA*⁺)
 - o *Escherichia coli* DH5α (*recA*⁻)
 - o *Micrococcus luteus*
 - o *Bacillus subtilis*
 - o ein Sproßpilz = *Candida albicans*
- Müller-Hinton-Platten für Bakterien
- Sabouraud-Agarplatten für den Pilz
- NaCl-Röhrchen a 2,7 ml
- Pipetten und sterile Pipettenspitzen

Durchführung

Von jeder der über Nacht bebrüteten Bouillon-Kulturen der verschiedenen Bakterien bzw. des Sproßpilzes werden sieben Verdünnungen im Verhältnis 1:10 mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung gemäß der Beschreibung s. S. 26 Aufgabe 6: Keimzahlbestimmung hergestellt (10⁻¹ bis 10⁻⁷).

Verdünnung). Die unverdünnte Ausgangskultur entspricht der 100-"Verdünnung".

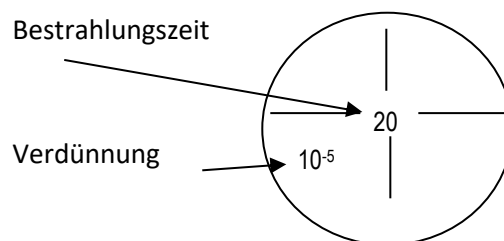
Von bis zu vier solcher Verdünnungen, für jeweils die gleiche Bestrahlungszeit, werden je 10 µl entsprechend nachfolgendem Schema auf vorher beschriftete Agarplatten aufgebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Verdünnungen nicht miteinander verlaufen.

Schema für das Auftragen einzelner Verdünnungen **einer** Bakterien-/Sprosspilzkultur auf Agarplatten entsprechend der Zeit der Bestrahlung

Bestrahlungszeit (s)	aufzutragende Verdünnungen (4 Verd. / Platte)	
	<i>E. coli</i> W3110 (recA ⁺) <i>Micrococcus luteus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i> DH5α (recA ⁻)
0	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁷	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷
5	10 ⁻³ -10 ⁻⁶	10 ⁻⁰ -10 ⁻³
15	10 ⁻² -10 ⁻⁵	10 ⁻⁰ -10 ⁻³
20	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁰ -10 ⁻²
20*	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	10 ⁻⁰ -10 ⁻³
30	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	10 ⁻⁰ -10 ⁻³
40	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	---
60	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	---
120	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	10 ⁻⁰ -10 ⁻²
120*	10 ⁻⁰ -10 ⁻⁷	10 ⁻⁰ -10 ⁻⁷
180	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	---
300	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	---
600	10 ⁻⁰ -10 ⁻³	10 ⁻⁰ -10 ⁻²

*) Diese Proben werden mit Deckel bestrahlt.

z.B.:



Nachdem alle Verdünnungen sorgfältig aufgetragen wurden, werden die Agarplatten so lange bei Raumtemperatur belassen, bis kein Flüssigkeitsfilm mehr auf den Platten erkennbar ist.

Die fertigen Platten werden dann **ohne Deckel** mit UV-Licht der Wellenlänge **366 nm** für die vorgeschriebene Zeit bestrahlt.

Die Platten bitte **nach aufsteigender Bestrahlungszeit stapeln**.

Die Bestrahlung übernimmt den/die Kursassistent:in.

21.: Untersuchung des Absterbevorgangs einer Kultur

Mikroorganismen werden in pharmazeutischen Produkten durch verschiedene Maßnahmen abgetötet oder aus ihnen entfernt. Wir wollen an wärmeempfindlichen und weniger empfindlichen Stämmen die Abtötung durch eine Temperatur von 55°C verfolgen, indem die Keimzahl gemessen wird.

Material

Bakterien: *Escherichia coli*
Pseudomonas aeruginosa
Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis

Sonstiges: NaCl-Röhrchen, 2,7 ml
Müller-Hinton-Testagarplatten
Wasserbad 55°C
Eppendorfpipetten

Durchführung

Gut bewachsene Kulturen von *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* und *B. subtilis* werden in 5 ml Nährlösung über Nacht bei 37°C herangezüchtet. Die Kulturen werden am nächsten Morgen 1:50 verdünnt und weitere 5 Stunden bebrütet. Sie erhalten die bis hierher vorbereiteten Bakteriensuspensionen zur weiteren Bearbeitung. Die Kulturen werden dann von Ihnen in ein Wasserbad mit 55°C eingebracht und folgende Messungen durchgeführt:

Zum Zeitpunkt des Einbringens ($t = 0$), nach 5 Minuten, nach 10 Minuten und dann alle 10 Minuten bis 60 Minuten wird die Temperatur in den Kulturen gemessen und die Keimzahl der lebenden Zellen bestimmt. Folgende Verdünnungen müssen aufgetragen werden:

Zeit	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
0	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$
5	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$
10	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-4} - 10^{-7}$	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^{-4} - 10^{-7}$
20	$10^{-3} - 10^{-6}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-4}$	$10^{-3} - 10^{-6}$
30	$10^{-2} - 10^{-5}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-3}$	$10^{-2} - 10^{-5}$
40	$10^0 - 10^{-4}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-3}$	$10^0 - 10^{-5}$
50	$10^0 - 10^{-4}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-3}$	$10^0 - 10^{-5}$
60	$10^0 - 10^{-3}$	$10^{-1} - 10^{-4}$	$10^0 - 10^{-3}$	$10^0 - 10^{-5}$

Die Keimzahlbestimmung erfolgt wie in Aufgabe 6 Seite 26 beschrieben.

22.: Konzentrationsbestimmung von Antibiotika

Zur Bestimmung des Gehaltes eines Antibiotikums in Körperflüssigkeiten (Blut, Urin usw.), Organen oder Proben von Arzneimitteln können chemische, physikochemische oder biologische Methoden angewendet werden. Biologische Tests erlauben dabei die Bestimmung von sehr geringen Substanzmengen. Die Testwerte entsprechen bei adäquater Technik dem tatsächlich vorhandenen Gehalt an biologisch wirksamer Substanz. Grundsätzlich können zwei Prinzipien dabei angewendet werden:

1. das Agardiffusionsprinzip
2. die Bestimmung über die Trübungsmessung (Turbidimetrie).

Wir wollen hier die Agardiffusionsmethode durchführen.

Das Prinzip ist wie folgt:

Ein auf 50°C abgekühlter Nähragar wird mit einer geringen Menge von Bakterien beimpft und in Petrischalen gleicher Größe in exakt gleichen Volumina ausgegossen, wobei die Unterlage eben sein muss, damit eine gleichmäßig dicke Schicht dieses Agars in der Petrischale entsteht.

Nach dem Erstarren werden Löcher in den Agar hineingestanzt, die zur Aufnahme der entsprechenden Antibiotikallösungen dienen. Das Antibiotikum diffundiert in die Umgebung des Loches und bildet einen Konzentrationsgradienten aus. Das Wachstum der im Agar befindlichen Mikroorganismen wird in Abhängigkeit von der Konzentration des im Agar befindlichen Antibiotikums gehemmt. Es entstehen um die Löcher Hemmzonen, deren Durchmesser direkt mit der eingebrachten Konzentration korrelieren.

Material

Agar:	<i>Bacillus subtilis</i> Sporenplatten
Antibiotika-Stammlösung:	Ampicillin 160 µg/ml
Sonstiges:	Eppendorfpipetten und sterile Pipettenspitzen
	Proben eines Antibiotikums: U1 1:10 und U 1:20 verdünnt

Durchführung

Dieser Teil ist für Sie schon vorbereitet:

Mit dem dicken Ende einer Pipettenspitze (ca. 6 mm Ø) werden in jede Agarplatte 4 Löcher gestanz, wobei der Abstand so zu wählen ist, dass sich die aller Voraussicht nach entstehenden Hemmhöfe gegenseitig nicht beeinflussen und auch den Rand der Petrischale nicht berühren.

Die größten Hemmhöfe, die entstehen werden, sind ca. 30 mm im Durchmesser, die kleinsten wenig mehr als 6 - 8 mm. Der Agar wird aus den Löchern entfernt. Dabei darf der Rand der Löcher nicht berührt werden, da er sonst deformiert wird und dann die Hemmhöfe nicht mehr kreisrund werden

Hier beginnt Ihre Aufgabe:

- Aus der Stammlösung, die das Antibiotikum Ampicillin ($160 \mu\text{g/ml}$) enthält, wird zunächst eine 1:10 Verdünnung und von dieser ausgehend eine geometrische Verdünnungsreihe in Röhrchen hergestellt.
- Im 1. Röhrchen sind 1,8 ml NaCl und in den übrigen Röhrchen 0,5 ml NaCl vorgelegt.
- Um die Verdünnung 1:10 für S 1 zu erhalten, werden 0,2 ml AB-Stammlösung zugegeben.
- Nach sorgfältigem Mischen werden aus dem 1. Röhrchen je 0,5 ml bis zum 6. überpipettiert.
- So erhalten Sie die gewünschte geometrische Verdünnungsreihe.

Standards _{AB}	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6
C _{AB} in $\mu\text{g/ml}$	16	8	4	2	1	0.5

- Die Platten werden nun so mit den verdünnten Lösungen beschickt, dass neben hohen Konzentrationen niedrige Konzentrationen zu liegen kommen, damit sich aller Voraussicht nach die Hemmhöfe gegenseitig nicht beeinträchtigen.
- In jedes Loch werden 20 μl der entsprechenden Verdünnung S 1 bis S 6 und die Proben eines Antibiotikums U 1:10 und U 1:20 mit einer Eppendorf-Pipette einpipettiert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine Tropfen an der Pipettenspitze hängenbleiben.
- Für jede Verdünnung ist eine neue Pipettenspitze zu benutzen.
- Nachdem ein Teil der Probelösung in den Agar eingezogen ist, werden die Platten in den Brutschrank bei 30°C gebracht und 24h bebrütet.
- **Im Gegensatz zum normalen Bebrütungsverfahren bleibt hier der Deckel oben und die Petrischale mit dem Agar unten.**

Praktikum VII

Resistenzplasmide

- Auswertung Aufgabe 19, Augentropfenversuch nach 21d
- Auswertung Aufgabe 20, UV-Versuch
- Auswertung Aufgabe 21, Absterbevorgang einer Kultur
- Auswertung Aufgabe 22, Konzentrationsbestimmung AB
- 23. Nachweis von Resistenzplasmiden

Auswertung Aufgabe 19 vom letzten Kurs: Augentropfen-Keimzahlbestimmung nach 21 Tagen

Auswertung Aufgabe 20 vom letzten Kurs: bakterizide Wirkung von UV-Licht

Für alle Zeitwerte werden die Kolonien jeder Verdünnungsstufe ausgezählt und daraus analog der Vorschrift im allgemeinen Teil des Praktikumsskriptes die Keimzahlen berechnet. Alle Einzeldaten für eine Bakterienkultur sind in einer Tabelle festzuhalten. Zu berücksichtigen ist, dass eine Verdünnungsstufe nicht zur Keimzahlbestimmung hinzugezogen werden kann, wenn nicht alle Kolonien einzelnstehend zählbar sind, wie dies bei zerkratzter Agaroberfläche oder bei zu großen Zellzahlen der Fall sein kann, oder wenn keine Kolonie vorhanden ist. In diesen Fällen ist in der Tabelle ein entsprechender Vermerk anzubringen.

Für jeden Zeitwert ist aus der Tabelle die als genaueste anzunehmende Keimzahl zu kennzeichnen. Diese Keimzahlen werden für die graphische Darstellung einer Absterbekinetik aller untersuchten Bakterienkulturen zugrundegelegt.

Für die graphische Darstellung wird zunächst der dekadische Logarithmus der Keimzahl berechnet. Damit alle Graphen denselben Ausgangspunkt haben, wird dann der Quotient $\log \text{KBE/ml}$ gebildet. Dieser wird dann gegen die Belichtungszeit in Sekunden aufgetragen. Die einzelnen Messwerte werden durch eine Kurve verbunden.

Verständnisfragen (sollen **zur Vorbesprechung** beantwortet sein!):

- Welchen evolutionären Vorteil birgt die Verwendung von Thymin anstelle von Uracil in der DNS, die die permanente Speicherform der genetischen Information darstellt?
- Aus welchem Grund wird die Bestrahlung der Bakterien mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm vorgenommen und nicht mit Licht der Wellenlänge 260 nm oder gar 235 nm?
- Was wird durch eine Mutation im *recA*-Gen bewirkt?
- Welche Auswirkung auf die UV-Empfindlichkeit ist aufgrund der *recA*-Mutation bei *E.coli* DH5 α gegenüber *E.coli* W3110 zu erwarten?

Zur Beantwortung der Fragen dient neben der vorliegenden Durchführungsbestimmung auch die ausgehändigte Zusatzinformation zu diesem Experiment.

Auswertung

getesteter Stamm.....

	ausgezählte Kolonien										
T Sek.	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	[KBE/ml]	log KBE/ml	Quotient in log KBE/ml
0											1
5											
15											
20											
20*											
30											
40											
60											
120											
120*											
180											
300											
600											

Auswertung Aufgabe 21 vom letzten Kurs: Absterbevorgang einer Kultur

Aus der Gleichung $S = S_0 \cdot e^{-kt}$ soll die **exponentielle Absterberate (-k)** berechnet werden. Dabei ist S_0 = Ausgangskeimzahl, S = Keimzahl zu einer beliebigen Zeit, t = Zeit.

Durch Umwandlung der Formel erhalten wir:

$$k = \frac{-2,303 \cdot \lg\left(\frac{S}{S_0}\right)}{t}$$

(die Dimension in min^{-1})

Unter Zuhilfenahme der Formel

$$\lg S = \frac{-k}{2,303} \cdot t + \lg S_0$$

kann k auch graphisch aus der Steigung der Geraden ermittelt werden.

Die Halbwertszeit wird aus der Formel

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2}{k} \text{ min berechnet.}$$

Alle Berechnungen können nur für den Zeitraum durchgeführt werden, in dem die Abhängigkeit der Keimzahl von der Zeit bei halblogarithmischer Auftragung eine Gerade ergibt. Die Halbwertszeit kann ebenfalls graphisch dargestellt werden. Tragen Sie die ermittelten Keimzahlen pro ml in Abhängigkeit von der Zeit in min und die gemessenen Temperaturen in Tabellen ein.

Stellen Sie die Ergebnisse graphisch dar, indem Sie den lg der Keimzahl gegen die Zeit auftragen. Ermitteln Sie k (graphisch und rechnerisch) und $t_{1/2}$ (graphisch und rechnerisch).

Anstelle der Absterberaten gibt man zur Kennzeichnung der Abtötung unter bestimmten Bedingungen bei einer bestimmten Population den D-Wert (Dezimalreduktionswert) an, d. h. die Zeit, welche zur Abtötung von 90 % der Zellen notwendig ist. Geben Sie anhand Ihrer Daten den experimentell ermittelten D-Wert für die jeweilige Kultur an.

Zeit	KbE/ml	log KbE/ml
0		
5		
10		
20		
30		
40		
50		
60		

Bestimmte Arzneimittel, z. B. Parenteralia und Ophthalmika, dürfen nur in steriler Form abgegeben werden. Die Bezeichnung steril besagt, dass das entsprechende Arzneimittel den Anforderungen des Sterilitätstestes genügt. Laut EuAB ist ein Arzneimittel als steril anzusehen, wenn unter den vorgeschriebenen Prüfbedingungen keine verunreinigenden Mikroorganismen nachweisbar sind. Nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis ist eine Kontaminationsrate bei sterilisierten Produkten von 10^{-6} zu akzeptieren (vgl. Bauer, Frömming und Führer, Lehrbuch für pharmazeutische Technologie). Bestimmen Sie anhand Ihrer Ergebnisse, nach welcher Zeit die Keimzahl in der Kultur auf 10^{-6} Zellen/ml reduziert wird (Gesamtletalitätsfaktor, F-Wert). Diskutieren Sie im Protokoll die Risiken, die eine Extrapolation beinhaltet. Ergebnistabelle.

Bakterium	K(graph.)	K(rechn.)	t _{1/2} (graph.)	t _{1/2} (rechn.)	D-Wert	F-Wert
<i>E.coli</i>						
<i>P.aeruginosa</i>						
<i>S.aureus</i>						
<i>B.subtilis</i>						

Auswertung Aufgabe 22 vom letzten Kurs: Konzentrationsbestimmung von Antibiotika

Nach der Bebrütung werden die entstandenen Hemmhöfe mit Hilfe eines Lineals 6x ausgemessen. Der Wert jedes Hemmhofdurchmessers wird in mm in die vorgegebene Wertetabelle (Tab.1 und 2) eingetragen. Von den sechs gemessenen Werten für jede Konzentration wird der Mittelwert gebildet, anschließend werden die Mittelwerte der Standard-Konzentrationen graphisch dargestellt. Auf der Abszisse (x-Achse) werden die Hemmhofdurchmesser aufgetragen, auf der Ordinate (y-Achse) der Zehnerlogarithmus der Konzentration. Hierzu kann man entweder halblog. Papier verwenden oder aber, was meist einfacher ist, den log der Konzentrationen errechnen und diesen linear auftragen.

Tabelle 1: C_{AB} : 160 $\mu\text{g/ml}$

Probe	Konzentration $\mu\text{g/ml}$	log Konzentration	Ampicillin mm
S1			
S2			
S3			
S4			
S5			
S6			

Ermitteln Sie den Bereich der Kurve, der linear verläuft. Nur dieser darf für die Auswertung der Untersuchungsprobe U verwendet werden.

Ermitteln Sie dann graphisch die Konzentration der zu untersuchenden Proben.

Geben Sie den Wert in $\mu\text{g/ml}$ an!

Tabelle 2:

Probe	Verdünnung	mm	log Konz.	Konzentration
Ampicillin U	1:10			
Ampicillin U	1:20			

Tabelle 3:

Probe	Verd.	Konz.	Ausgangskonz.	Sollwert	% vom Sollwert	Fehler in %
U	1:10					
U	1:20					

Resistenzplasmide

23.: Nachweis von Resistenzplasmiden

Plasmide sind genetische Elemente, die in Bakterien neben dem Chromosom vorkommen können. Ein Teil der genetischen Information von Plasmiden wird immer benötigt, um für Funktionen zu codieren, die die Replikation des Plasmidmoleküls ermöglichen. Dadurch wird gewährleistet, dass bei der Verdopplung der Bakterienzelle jede Tochterzelle wieder Plasmide enthält. Einige Plasmide tragen Gene für zusätzliche Eigenschaften, durch die ein Transfer des Plasmidmoleküls von einer Zelle auf eine plasmidfreie andere Zelle derselben Generation ermöglicht wird (konjugative Plasmide).

Ein weiterer Teil der genetischen Information von Plasmiden kann für Funktionen codieren, die der jeweiligen Bakterienzelle unter bestimmten Umgebungsbedingungen Selektionsvorteile bieten.

Beispiele für solche Funktionen sind:

- * bei Salmonellen die Bildung von Aerobactinen, komplexbildenden Substanzen, die das Spurenelement Eisen in geringsten Konzentration für die Bakterienzelle verfügbar machen,
- * bei Pseudomonaden die Bildung von Toluol-abbauenden Enzymen, wodurch zusätzliche Nährstoffe verfügbar gemacht werden,
- * bei vielen Bakterien die Bildung von Antibiotikaresistenzfunktionen, die es den jeweiligen Bakterienzellen ermöglichen, in Anwesenheit dieser Substanzen zu wachsen.

Plasmide, die Gene für Antibiotikaresistenzfunktionen tragen, werden R-Plasmide genannt. R-Plasmide, die zur Konjugation befähigt sind, können daher nicht nur von der Mutter- auf die Tochterzelle weitergegeben werden (vertikaler Plasmidtransfer), sondern unter geeigneten Bedingungen auch auf nicht plasmidhaltige Zellen derselben Generation, in einigen Fällen sogar auf Zellen einer anderen Bakterienspezies (horizontaler Plasmidtransfer).

Die Kenntnis über das Vorhandensein konjugativer R-Plasmide ist daher für Untersuchungen zur Epidemiologie von Antibiotikaresistenz wichtig. Plasmide können auf verschiedene Weise nachgewiesen werden:

- * durch Isolierung und physikalische Charakterisierung der Plasmid-DNS,
- * durch konjugativen Transfer der Plasmid-DNS auf andere Bakterienstämme.

In dieser Aufgabe soll das konjugative R-Plasmid RP1, das die genetische Information für Resistenz gegenüber Ampicillin und Tetracyclin trägt, von einem Laktose-abbauenden *E.coli* Stamm W3110 (DONOR) auf den Laktose-nichtabbauenden, nalidixinsäureresistenten Stamm *E.coli* 31 N (REZIPIENT) übertragen werden.

Die beiden *E.coli* Stämme besitzen folgende genetische Eigenschaften, die auf dem Chromosom und –
im Falle des Donors - auf dem Plasmid lokalisiert sind:

<i>E.coli</i> Stamm	Chromosomeneigenschaft	Plasmideigenschaft
W3110 (DONOR)	lac ⁺ , Nal ^S	Amp ^R , Tet ^R , tra ⁺
31 N (REZIPIENT)	lac ⁻ , Nal ^R , Strep ^R	-----

Abkürzungen:

- Amp^R = Resistenz gegen Ampicillin
- Nal^R = Resistenz gegen Nalidixinsäure
- Nal^S = Empfindlichkeit gegen Nalidixinsäure
- Tet^R = Resistenz gegen Tetracyclin
- Lac⁺ = Fähigkeit zum Abbau von Laktose
- lac⁻ = Unvermögen zum Abbau von Laktose
- tra⁺ = Fähigkeit zur Konjugation

Material

Bakterien: Je 3 ml von über Nacht bei 37°C in N1-Bouillon bebrüteten Bakterienkulturen der *Escherichia coli* Stämme 31 N (Rezipient) und W3110 mit Plasmid RP1 (Donor)

Sonstiges:

Antibiotikahaltiger Chinablau-Laktose-Agar
 Glasspatel = Drygalskispatel
 NaCl-Röhrchen a 2,7 ml
 Eppendorfpipetten und sterile Pipettenspitzen

Durchführung

Chinablau-Laktose-Agarplatten wurden vorbereitet:

- a) mit 500 µg/ml Ampicillin (A)
- b) mit 2,5 µg/ml Tetracyclin (T)
- c) mit 6,25 µg/ml Nalidixinsäure (N)
- d) mit 500 µg/ml Ampicillin und 6,25 µg/ml Nalidixinsäure (A/N)
- e) mit 2,5 µg/ml Tetracyclin und 6,25 µg/ml Nalidixinsäure (T/N)

Bereits für Sie vorbereitet:

Je 1 ml der Kultur des Donor und der des Rezipienten wird in ein steriles Reagenzglaschen pipettiert und gemischt (10 Uhr heute morgen). Dieses Röhrchen mit Mischkultur sowie die beiden Ausgangskulturen werden anschließend für 3,5 Stunden (ohne weiteres Schütteln) im Brutschrank bei 37° bebrütet.

In diesem Zeitraum erfolgt der konjugative Transfer des Plasmides RP1 vom Donor auf den Rezipienten. Nach heute gültigen Modellvorstellungen wird zunächst durch Genprodukte des tra-Operons einer der beiden DNS-Stränge des Plasmides in der Donorzelle enzymatisch gespalten. Die durch andere tra-Genprodukte produzierten Pili, fadenartige Proteine auf der Zelloberfläche der Donorzellen, vermitteln einen Kontakt zu Rezipientenzellen. Die dadurch erreichte enge räumliche Nähe beider Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für den nachfolgenden Plasmidtransfer. Mit Hilfe eines spezifischen Tra-Proteins wird der gespaltene DNS-Plasmidstrang aus der Donorzelle über eine Plasmabrücke in die Rezipientenzelle geschleust. In einem gleichzeitig ablaufenden Prozess wird im Donor am 3' Ende der komplementäre Doppelstrang nach einem sogenannten "Rolling circle"-Mechanismus synthetisiert. Die Synthese des Doppelstranges im Rezipienten erfolgt diskontinuierlich an RNA-Primer Fragmenten. Am Ende der Konjugation besitzen also beide Zellen eine identische Kopie des konjugativen R-Plasmids. Der Plasmid tragende Rezipient wird dann als Transkonjugand bezeichnet. Ebenso wie eine Donorzelle kann auch eine Transkonjugandenzelle das konjugative R-Plasmid auf plasmidfreie Rezipientenzellen übertragen, selbst jedoch nicht wieder als Rezipient für das gleiche Plasmid fungieren.

Zur Selektion bestimmter Stämme mittels Antibiotika werden Antibiotika-haltige Agarplatten verwendet.

Dabei werden die Antibiotika bereits bei der Agarherstellung mit in das Nährmedium eingebracht.

Nach 3,5 Std. Wachstum von Donor-, Rezipienten- und Mischkultur wird von jeder der 3 Kulturen eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Dafür stehen Ihnen je 3 Ständer mit je 6 Röhrchen a 2,7 ml sterilem NaCl zur Verfügung. Die unverdünnten Bakteriensuspensionen spateln Sie bitte direkt aus dem jeweiligen Kulturröhrchen aus. Die verschiedenen Verdünnungen der zu prüfenden Stämme entnehmen Sie nachfolgender Tabelle. Gespatelt werden je **100 µl**.

Agar	Donor (lac ⁺)	Rezipient (lac ⁻)	Mischkultur
Amp	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶	10 ⁰	10 ⁻⁰ – 10 ⁻⁵
Tet	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶	10 ⁰	10 ⁻⁰ – 10 ⁻⁵
Nal	10 ⁰	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶
Amp, Nal	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻⁰ – 10 ⁻⁴
Tet, Nal	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻⁰ – 10 ⁻⁴

Die Agarplatten werden mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 37°C bebrütet (ca. 16 - 18 h).

Tragen Sie in nachfolgende Tabelle ein, auf welchem Selektivmedium welcher Bakterienstamm wachsen wird!

		Donor	Rezipient	Mischkultur Transkonjuganten
	Chromosom	Lac ⁺ Nal-s, Sm-s	Lac- Nal-r, Sm-r	Lac- Nal-r, Sm-r
	Plasmid	Tra ⁺ Amp-r, Tet-r	—	Tra ⁺ Amp-r, Tet-r
S e l e k t i v m e d i e n	+ Ampicillin			
	+ Tetracyclin			
	+ Nalidixinsr.			
	+ Ampicillin + Nalidixinsr.			
	+ Tetracyclin + Nalidixinsr.			

Praktikum VIII

Mykologie

- Auswertung Aufgabe 23, Resistenzplasmide

Mykologie

- 24. Differenzierung Sproßpilze
 - 24.1. Makroskopie
 - 24.2. Mikroskopie- Nativpräparate
- 25. Dermatophyten
 - 25.1. Makroskopie
 - 25.2. Mikroskopie-Klebestreifenpräparate
- 26. Schimmelpilze
 - 26.1. Kulturmorphologie
 - 26.2 Mikroskopie-Klebestreifenpräparate

Auswertung Aufgabe 23 vom letzten Kurs: Nachweis von Resistenzplasmiden

Die koloniebildenden Einheiten (KBE) der einzelnen Verdünnungen werden ausgezählt und daraus die Keimzahlen errechnet.

Als Kontrolle werden mit Hilfe steriler Ösen einzelne Kolonien von der Amp-Nal-Platte auf eine frische Tet-Nal-Platte, sowie von der Tet-Nal-Platte auf eine Amp-Nal-Platte übertragen. Diese Platten werden bei 37°C bebrütet und am folgenden Kurstag abgelesen. Alle übertragenen Kolonien müssen sichtbares Wachstum zeigen.

Anhand dieser Ergebnisse wird die Übertragungsfrequenz als das Verhältnis der Zahl R-Faktor tragenden Rezipienten (Transkonjuganden) zur Zahl der Donorzellen errechnet.

Tragen Sie die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung in die folgende Tabelle ein und vergleichen Sie mit den von Ihnen erwarteten Ergebnissen (s. Tabelle Aufg. 22, Praktikum VII, S.90)

Agar	Donor lac ⁺ Nal ^S Amp ^R Tet ^R tra ⁺	Rezipient lac ⁺ Nal ^R Strep ^R	Mischkultur
Amp			
Tet			
Nal			
Amp Nal			
Tet Nal			

Die Übertragungsfrequenz ist bei Selektion
auf Tetracyclin
auf Ampicillin

Fragen:

1. Welche genetischen Eigenschaften besitzen die Transkonjugandenzellen?
2. Welche Bakterienarten finden sich in der Mischkultur?
3. Wodurch kann ausgeschlossen werden, dass es sich wirklich um Transkonjuganden handelt und nicht um nalidixinsäureresistente Mutanten des Donors?
4. Durch welche einfache Versuchsanordnung könnte man prüfen, dass es sich um Transkonjuganden und nicht um Ampicillin- oder tetracyclinresistente Mutanten des Rezipienten handelt?

(Bei der Beantwortung der Fragen 3 und 4 ist eine Gegenüberstellung der genetischen Eigenschaften der jeweils anzunehmenden Mutanten und der Transkonjuganden hilfreich!)

EINFÜHRUNG MYKOLOGIE

Medizinischer Fortschritt schafft neue Therapieansätze und Behandlungsmöglichkeiten.

Insbesondere die Bereiche der Intensivmedizin, Organtransplantation und Hämato-Onkologie haben sich in den vergangenen 20 Jahren enorm weiterentwickelt und Patienten mit ehemals fatalen Erkrankungen neue Überlebenschancen gegeben. Dadurch notwendig gewordene Breitbandantibiosen, Antibiotikaphylaxen, invasive Prozeduren und medikamentöse Immunsuppression haben aber auch eine Kehrseite: Die stetige Zunahme invasiver Pilzinfektionen.

Zielstellung

In diesem Praktikum sollen die drei großen Gruppen humanpathogener Pilze kennen gelernt sowie Möglichkeiten ihrer Differenzierung und Identifizierung vorgestellt werden.

24. Sprosspilze

Sprosspilze gehören zur physiologischen Flora der menschlichen Schleimhäute, können aber bei Schwächung der Immunabwehr des Menschen oder Verminderung der bakteriellen Kolonisation nach Antibiotikatherapie zu symptomatischen Infektionen führen (opportunistische Erreger).

Von den ca. 15 humanpathogenen *Candida*-Spezies sind die fünf mit Abstand am häufigsten an Infektionen beteiligten Arten *C. albicans*, *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*). Jede dieser Arten weist Besonderheiten im Verteilungsmuster hervorgerufener Erkrankungen, ihrer Virulenz und der natürlichen Empfindlichkeit gegenüber Antimykotika auf. Das bedeutet, dass man meistens schon anhand der Identifizierung der Spezies auf die geeignete Therapie schließen kann. Die am häufigsten gefundene, virulenteste Art stellt *C. albicans* dar, die aber natürlicherweise einer Therapie mit allen verfügbaren Antimykotika zugänglich ist.

Im Laboralltag wird daher die möglichst schnelle Identifizierung sowie die Unterscheidung von *C. albicans* und non-*albicans*-Spezies priorisiert.

24.1.: Beurteilung der Makroskopie von Sprosspilzkulturen und Unterscheidung der wichtigsten Spezies mittels chromogener Nährmedien

Tragen Sie Ihre Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle ein.

24.2.: Beurteilung der Mikroskopie von Sprosspilzkulturen

Materialien:

Kulturen auf Sabouraud-Dextrose-Agar und Chromogen-Agar von:

- *Candida albicans*
 - *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*)
 - *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*)
 - *Cryptococcus neoformans*
-
- physiologische Kochsalzlösung
 - Objektträger
 - kalibrierte sterile Ösen (10 µl)
 - Deckgläschen

Durchführung

Nativpräparate¹

- Stellen Sie von den unterschiedlichen Spezies **Nativpräparate** her:
- Pipettieren Sie einen Tropfen physiologische Kochsalzlösung auf einen Objektträger.
- Nehmen Sie mit einer sterilen Öse wenig Kulturmateriel von der Sabouraud-Dextrose-Agarplatte auf (leichtes Antippen einer Kolonie).
- Reiben Sie wenig Kulturmateriel zunächst neben den Tropfen physiologische Kochsalzlösung auf den Objektträger und vermischen Sie beides anschließend.
- Decken Sie dieses Präparat sofort mit einem Deckglas ab.
- Achtung! Nicht lufttrocknen!
- Mikroskopieren Sie das Nativpräparat mit dem 40er Objektiv.
- Hinweis: Um die Ebene besser finden zu können, stellen Sie sich den Lichtstrahl auf den Deckgläschen-Rand ein.

Wie unterscheiden sich die einzelnen Spezies im Nativpräparat?

Fertigen sie eine kurze Skizze jeder Art an.

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Makroskopie Sabouraud- Dextrose-Agar				
Makroskopie Chromogen- Agar				
Mikroskopie				
Können Sie die Arten im Nativpräparat gut voneinander unterscheiden?				

¹ Alle Kulturen wurden für 2 Tage bei 37°C bebrütet

Identifizierung anhand der biochemischen Leistungsprüfung

Analog zu den Bakterien können auch Sprosspilze anhand charakteristischer biochemischer Stoffwechselleistungen und Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen identifiziert werden.

Die Auswertung dieser Stoffwechselleistungsprüfung erfolgt nach 48h Inkubationszeit und dauert damit länger als die „Bunte Reihe“ der Bakterien. Bestimmt werden hierbei Assimilationsprofile verschiedener Nährstoffe und das Fermentationsvermögen.

Identifizierung heute: MALDI-ToF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization/ Time-of-flight)

Die meisten Routinelabore nutzen heutzutage die schnelle, genaue und kostengünstige Identifizierung mittels Massenspektrometrie. Zur Erinnerung: Bei diesem Verfahren werden mit einem gepulsten Laserstrahl Ionen aus dem Teststamm herausgelöst, in einem elektrischen Feld beschleunigt und ihre Auftreffgeschwindigkeiten auf einem Detektor in Form von Spektren verzeichnet. Die detektierten Spektren werden gegenüber einer Referenzdatenbank abgeglichen und erlauben so die Identifizierung von Bakterien und Pilzen.

25.: Dermatophyten

Dermatophyten sind Fadenpilze, die sich von Keratin ernähren und dadurch die keratinisierte äußerste Hautschicht (Epidermis) und keratinhaltige Hautanhangsgebilde (Nägel und Haare) befallen können. Dabei gibt es Arten, die primär von Mensch zu Mensch, von Tier zu Mensch (Meerschweinchen, Katzen...) oder aus der unbelebten Umwelt auf den Menschen übertragen werden. Diese große Gruppe besteht aus drei Genera, die teilweise unterschiedliche Körperareale befallen und mikroskopisch anhand ihrer Vermehrungsorgane (Konidien, s.o.) voneinander unterschieden werden können.

Zielstellung:

Differenzierung von Dermatophyten anhand ihrer Morphologie und Konidiogenese.

Materialien:

Kulturen auf Sabouraud-Dextrose-Agar (3 Wochen bei 30°C bebrütet) von:

- Stamm 1
- Stamm 2
- Stamm 3

Alle Kulturen wurden nach Bebrütung abgetötet, so dass keine Infektionsgefahr besteht.

25.1.: Kulturmorphologie

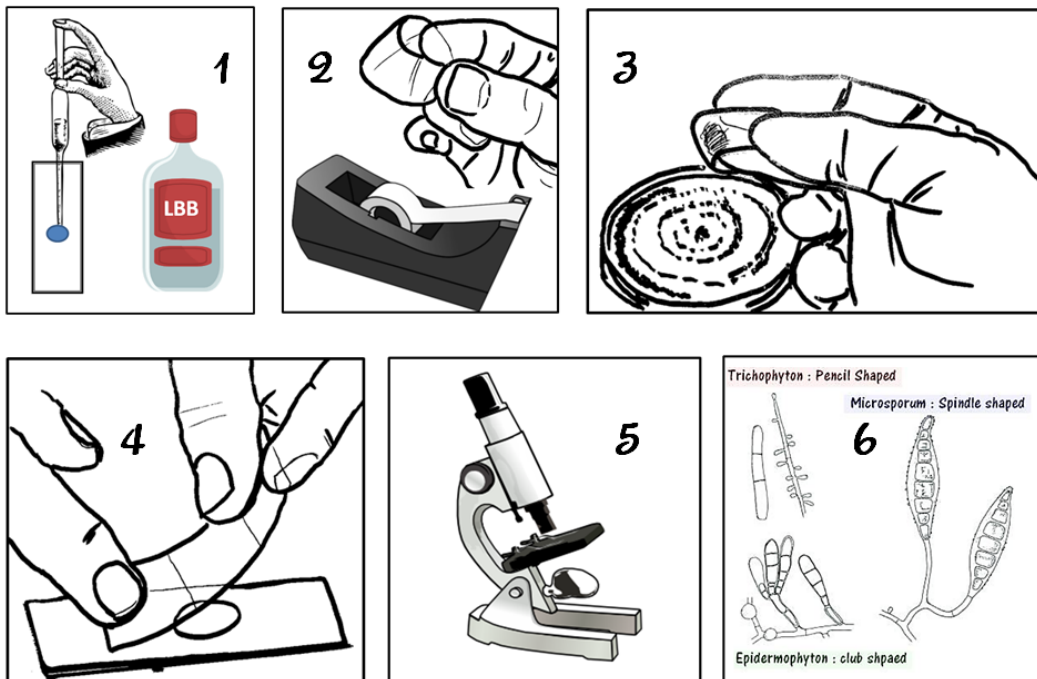
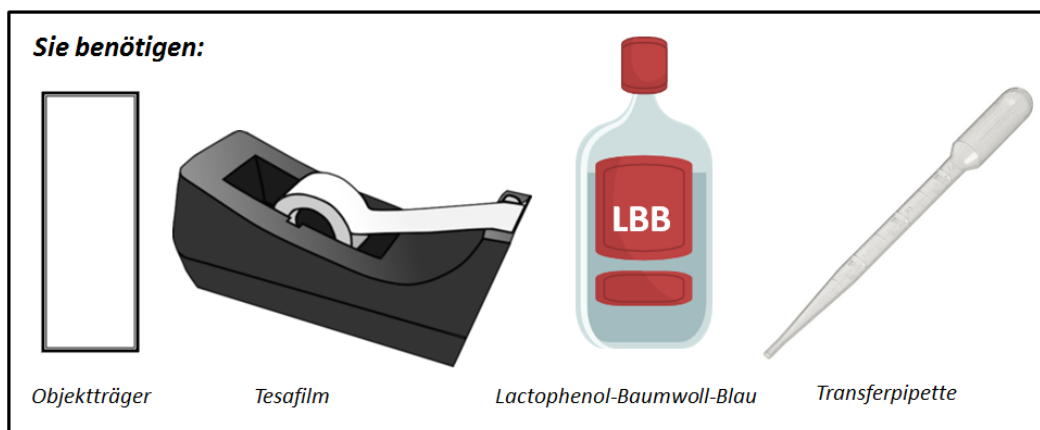
- Betrachten Sie das unterschiedliche Wachstum der Kulturen.
- Versuchen Sie, Farbe und Erscheinung der Kulturen zu beschreiben (samartig – gipsartig – rau – wollig – flach – raulederartig – wachsartig – wie Zuckerwatte etc.)

25.2.: Klebestreifenpräparate: Färbung mit Laktophenol-Baumwollblau-Lösung

- Fertigen Sie anhand der Anleitung auf der nächsten Seite Klebestreifenpräparate der drei Dermatophyten an.

Versuchen Sie, anhand der gesehenen Strukturen die Pilze den drei Genera (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*) zuzuordnen (siehe Beschreibungen auf Seite 94)

Klebestreifenpräparate: Färbung mit Laktophenol-Baumwollblau-Lösung

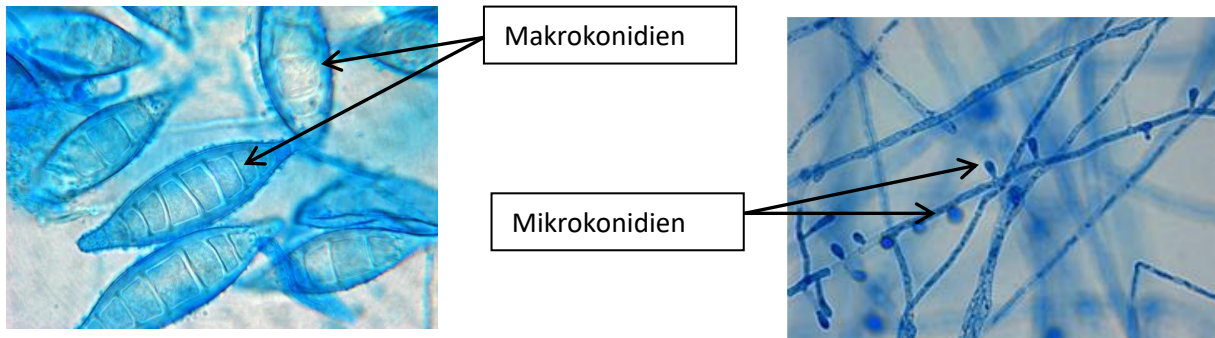


- 1: Einen Tropfen Laktophenol-Baumwollblau-Lösung (LBB) auf einen Objektträger geben
- 2: Etwas Tesafilm abreißen und zu einer Schlaufe formen → Klebeseite nach unten!
- 3: Mit der Klebeseite auf den Kolonierand tippen und etwas Material abnehmen
- 4: Tesafilm mit der Klebeseite nach unten direkt auf den Objektträger in den Tropfen LBB kleben
- 5: Objektträger erst mit dem 10er, dann mit dem 40er Objektiv mikroskopieren
- 6: Charakteristische Makro- und Mikrokonidien finden!

	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3
Makroskopie			
Mikroskopie			
Identifizierung			
Klinische Bedeutung			

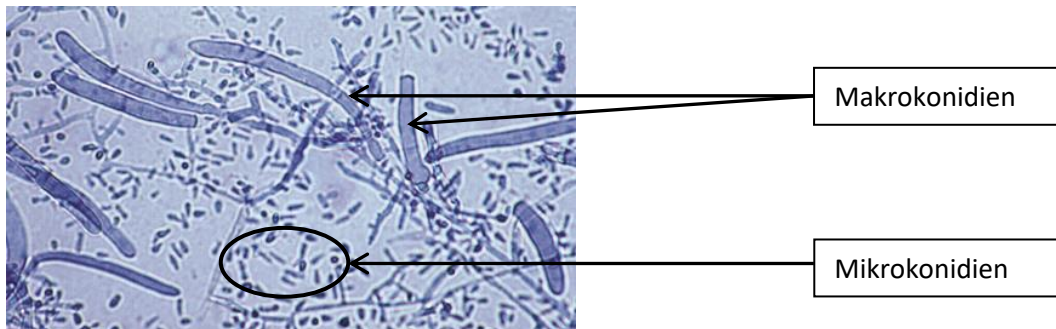
Microsporum canis:

- Reichlich Makrokonidien; spindelförmig, rau, dickwandig
- Mikrokonidien vorhanden.



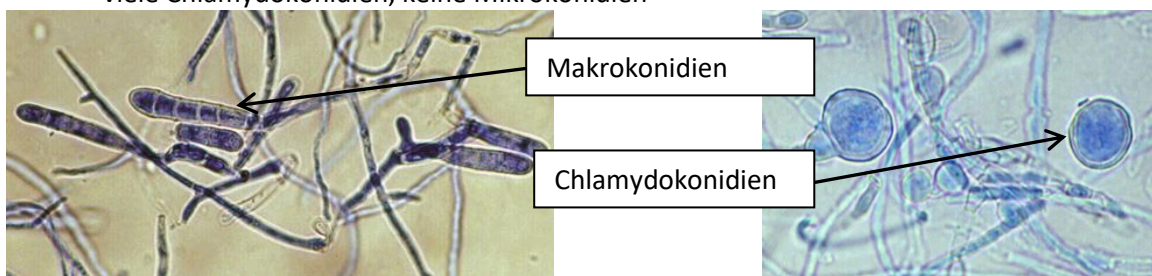
Trichophyton rubrum:

- sehr wenige bis keine Makrokonidien; dünnwandig, glatt, schmal
- sehr viele Mikrokonidien



Epidermophyton floccosum:

- viele Makrokonidien; keulenförmig, glattwandig, dickwandig
- viele Chlamydokonidien, keine Mikrokonidien



26.: Schimmelpilze

Als „Schimmelpilze“ bezeichnet man lapidar Fadenpilze, die unsere Umwelt besiedeln. Sie gehören nicht zur physiologischen Standortflora des Menschen und sind nur selten Verursacher von invasiven Infektionen. Ihre Bedeutung im Alltag liegt vor allem in den Bereichen der Lebensmittelherstellung (Blauschimmelpilze) und dem Lebensmittelverderb („verschimmeln“). Dem Pilz *Penicillium notatum* verdanken wir Penicillin!

Aber auch so manches feuchte Bad bietet ideale Lebensbedingungen für Schimmelpilze, deren Sporen bei massenhafter Vermehrung nicht selten für allergische Beschwerden sorgen.

In der Gruppe der organtransplantierten und hämatoonkologischen Patienten können Schimmelpilze schwerwiegende Infektionen hervorrufen, die nicht selten das Todesurteil für diese Menschen darstellen. Dabei sind wohl die häufigsten Infektionen Pneumonien durch *Aspergillus* spp., die sekundär auch in andere Organe streuen können. Seltener sind ebenfalls von der Inhalation von Sporen ausgehende Infektionen mit den sogenannten Zygomyceten (*Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*), die ein aggressives tumorartiges Wachstum zeigen und in der Regel primär operativ angegangen werden müssen. Infektionen des äußeren Gehörgangs werden klassischerweise von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger* hervorgerufen.

Pilzbälle (Myzetome) können sich vor allem bei Immunsupprimierten (Diabetiker!) in präformierten Kavitäten ausbilden (Nasennebenhöhlen, Lungenkavernen nach durchgemachter Tuberkulose) und müssen dann operativ entfernt werden.

Zielstellung:

Differenzierung von Schimmelpilzen anhand ihrer Morphologie und Konidiogenese

Materialien

5 verschiedene Kulturen von Schimmelpilzen (A, B, C, D, E)²

1 Flasche mit Laktophenol-Baumwollblau-Lösung

Alle Kulturen wurden nach Bebrütung abgetötet, so dass keine Infektionsgefahr besteht.

Durchführung

27.6.: Kulturmorphologie

- Beschreiben Sie die unterschiedliche Kulturmorphologie hinsichtlich Farbe und Beschaffenheit! (pelzig, wattig, flauschig, wollig, samtig, filzig, flach, begrenzt, expandierend, sternförmig ...)

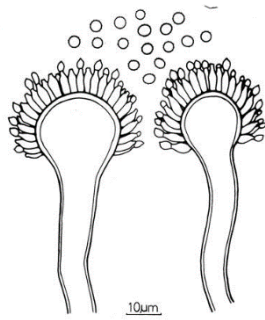
	Koloniefarbe	Koloniebeschaffenheit
A		
B		
C		
D		
E		

26.2.: Klebestreifenpräparat: Färbung mit Laktophenol-Baumwollblau-Lösung²

- Fertigen Sie von jedem Pilz (A-E) ein Tesafilm-Abklatschpräparat analog zu Aufgabe 26.2 an!
- Mikroskopieren Sie die Pilze jeweils im 10er und 40er Objektiv und versuchen Sie, die Spezies anhand ihrer Fruktifikationsorgane zu identifizieren.
- Als Vergleich dienen Ihnen die Abbildungen auf der nächsten Seite.

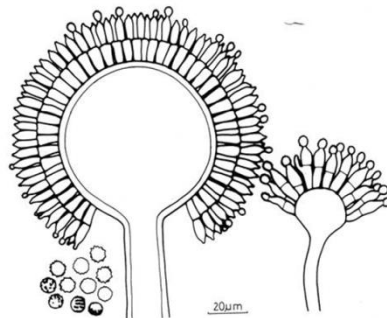
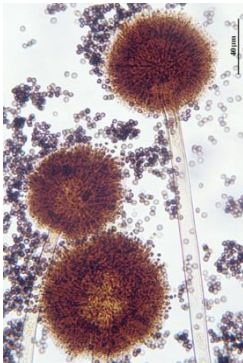
Welche Bedeutung haben die ermittelten Spezies für den Menschen (typische hervorgerufene Erkrankungen; möglicher Nutzen)?

	Mikroskopie	Identifiziert als...	Bedeutung für den Menschen
A			
B			
C			
D			
E			



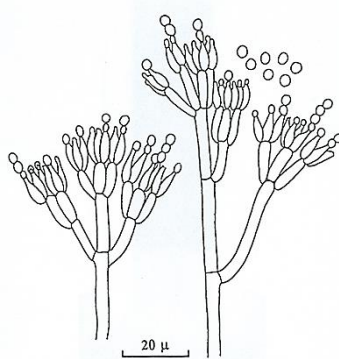
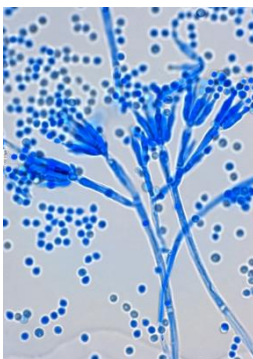
Aspergillus fumigatus:

- Das „Köpfchen“ (Konidiophore) ist subsphärisch (fast rund)
- Phialiden (Zellen, die die Sporen bilden) sind einreihig
- Phialiden wachsen säulenartig vom Köpfchen nach oben
- Sporen sind graugrünlich gefärbt („*fumigatus*“ = **rauchig**)
- Hyphen, septiert, farblos



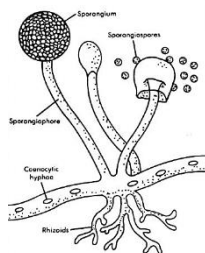
Aspergillus niger:

- „Köpfchen“ ist rund
- Phialiden (Zellen, die die Sporen bilden) sind zweireihig
- Phialiden wachsen strahlenförmig um das ganze Köpfchen herum
- Sporen sind schwarzbraun gefärbt („*niger*“ = **schwarz**)
- Hyphen septiert, braun pigmentiert



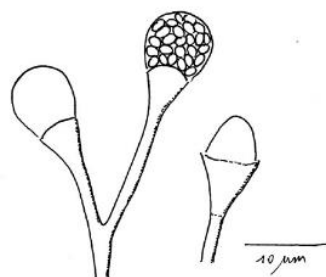
Penicillium spp:

- Phialiden (Zellen, die die Sporen bilden) sind flaschenförmig
- Kein „Köpfchen“, sondern baumartige Verzweigungen
- ungefärbte septierte Hyphen



Rhizopus microsporus:

- Gut sichtbares Wurzelwerk (*Rhizoid*, daher der Name!)
- „Köpfchen“ sehen ohne Sporen aus wie Regenschirme
- Unseptierte dicke Hyphen, kaum verzweigt, braun pigmentiert



Lichtheimia corymbifera (Mucor spp.)

- Köpfchen mit Sporen ist birnenförmig
- Das „Innere“ des Köpfchens ohne Sporen hat eine konische Form
- Sporen farblos bis hellgrau
- Unseptierte dicke Hyphen
- kaum oder kein Wurzelwerk

Praktikum IX

Parasitologie

- 27. Parasitennachweis im Blut
 - 27.1 Blutausstrich
 - 27.2 Dicker Tropfen
 - 27.3 Malaria-Schnelltest – Demo
- 28. Parasitennachweis im Stuhl
 - 28.1 Anreicherungsverfahren
 - 28.2 Stuhlaufschwemmung

Parasitologie und Zoonosen

Stichworte zur Vorbereitung des Praktikums

Zoonosen

Definition Zoonosen

Nennen Sie Beispiele für zoonotische Infektionserreger

Parasiten

Bakterien

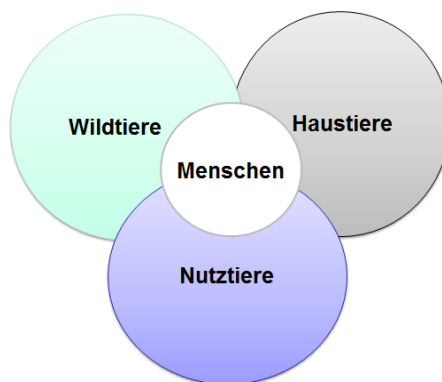
Pilze

Viren

Nennen Sie Beispiele für direkte und indirekte Übertragungswege von Zoonosen:

direkt

indirekt



Parasiten

Definition Parasitosen

Ektoparasiten

Endoparasiten

Protozoen als Durchfallerreger

Welche Parasiten mit Vektorenfunktion übertragen welche Infektionserreger?

Infektionsquellen für Toxoplasmose

Zwischenwirt

Fehlwirt

Endwirt

Beispiel: Lebenszyklus des Rinder- und Schweinebandwurms



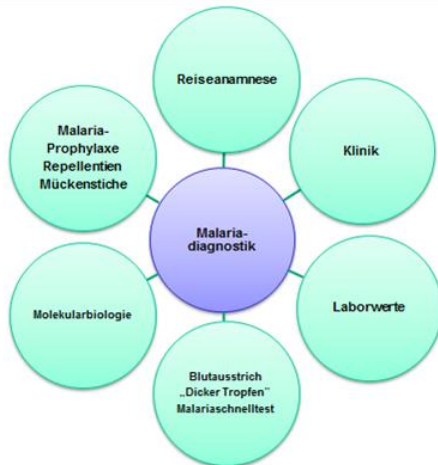
Parasiten		
Protozoen	Helminthen	Arthropoden

Nachweismöglichkeiten von Parasiten			
Makroskopisch	Mikroskopisch	Serologisch	Molekularbiologisch

27.: Nachweis von Blutparasiten am Beispiel der Malaria

Die Malaria ist weltweit eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten. Sie tritt in tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente, außer Australien, auf. Etwa 40% der Weltbevölkerung lebt in Malaria-Endemiegebieten. Dort erkranken schätzungsweise 216 Millionen Menschen pro Jahr (2016). Weltweit sterben jährlich ca. 445.000 Menschen (2016) an Malaria, etwa dreiviertel von ihnen sind Kinder unter fünf Jahren. Malaria wird überwiegend in Ländern Afrikas, Asiens und Südamerikas erworben, wobei Afrika mit etwa 90% der Fälle am meisten betroffen ist.

Bei der Malariadiagnostik sind der Nachweis, die Identifizierung der Plasmodienspezies sowie die Quantifizierung der Parasitämie therapierelevant!



Zielstellung

Anfertigung, Färbung und Mikroskopie von dünnen Blutaussstrichen und einem „Dicken Tropfen“ zur Untersuchung auf Blutparasiten.

Materialien:

- Mikroskop
- Objektträger (fettfrei!)
- Stechhilfe
- Vorbereiteter Blutaussstrich von Patient
- Die Reagenzien und Anleitung für die Giemsa-Färbung finden Sie an den Färbetischen.

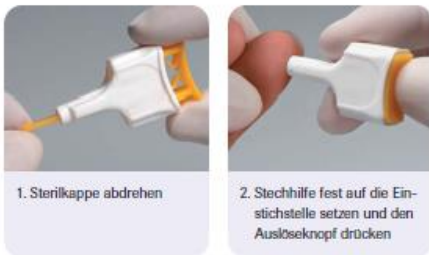
Durchführung

Anfertigung von Vollblutpräparaten

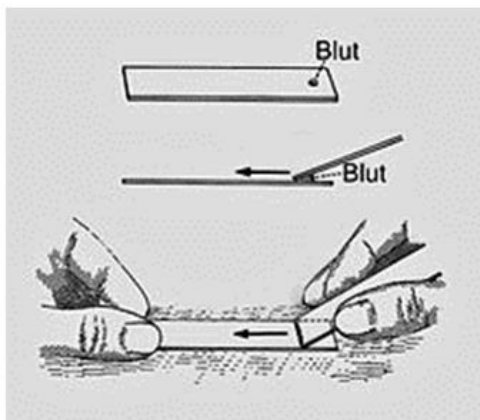
27.1.: Gefärbter dünner Blutaussstrich

- Reinigung der Kapillarblutentnahmestelle (Fingerbeere bzw. Ohrläppchen) mit Händedesinfektion
- mit Stechhilfe stechen und Blut gewinnen (siehe Abbildung)

ACCU-CHEK® Safe-T-Pro® Uno



- einen kleinen Tropfen Kapillarblut auf den Rand des Objektträgers aufbringen
- mit der Kante eines zweiten Objektträgers in den Blutstropfen eintauchen und warten, dass sich das Blut auf der ganzen Breite des Objektträgers verteilt
- den zweiten Objektträger in einem ca. 30° Winkel halten und zügig einen Ausstrich anfertigen
- nicht zu fest drücken (Erythrozyten werden sonst beschädigt)
- mind. 30min lufttrocknen lassen
- **Hinweis:** Zum Ende des Ausstriches sollte sich eine dünne „Fahne“ ausbilden (Einzelschicht von Erythrozyten).



27.2.: „Dicker Tropfen“

- den Objektträger mittig mit einem zweiten Objektträger ankratzen
- einen kleinen Tropfen Kapillarblut auf die angekratzte Stelle des Objektträgers aufbringen
- mit der Spitze des zweiten Objektträgers den Blutstropfen ca. auf 1,5 cm verteilen
- mind. 30min lufttrocknen lassen

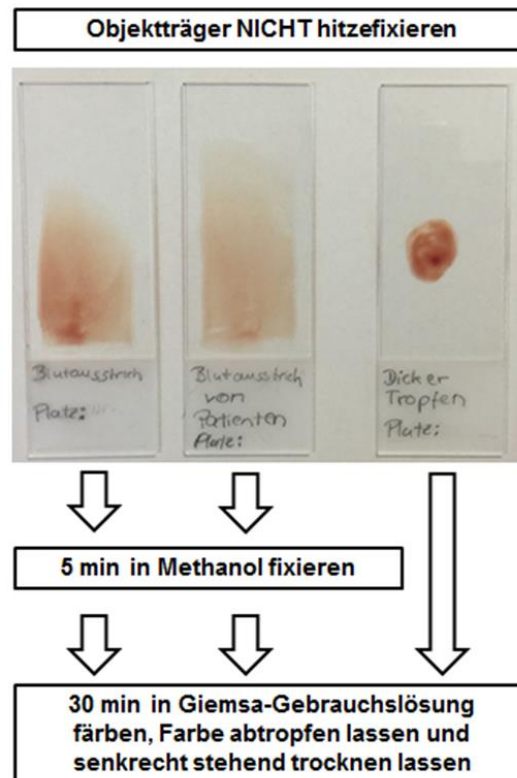
Allgemeiner Hinweis:

Wenn Sie von einem Patienten Blut abnehmen und zur Malaria-Untersuchung an ein Labor schicken, erfolgt die Abnahme in ein EDTA-Röhrchen!

Bitte Blutausstriche und „Dicken Tropfen“ beschriften, zur Seite legen und lufttrocknen lassen!

Färbungen

Färben Sie die vollständig getrockneten Präparate, wie in der Abbildung dargestellt, mit der bereits vorbereiteten Giemsa-Gebrauchslösung (3,5 ml Giemsa-Stammlösung + 96,5 ml Weise Puffer)



Mikroskopie und Auswertung

- Mikroskopie mit Ölimmersion und dem 100er Objektiv

Blutausstrich:

Der fixierte und anschließend gefärbte Blutausstrich lässt eine Beurteilung der zellulären Bestandteile des Blutes (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) zu.

Er ermöglicht den Nachweis von Blutparasiten, deren Speziesbestimmung und die Ermittlung des Ausmaßes einer Parasitämie im Fall einer Plasmodieninfektion.

„Dicker Tropfen“:

Die Erythrozyten lysieren in der Giemsa-Gebrauchslösung ohne die vorherige Fixierung. Es sind Leukozyten zu sehen. Im Falle einer Plasmodieninfektion werden die Parasiten aus den lysierten Erythrozyten freigesetzt.

Durch die Untersuchung einer relativ großen Blutmenge (mehrere Schichten Erythrozyten übereinander) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Parasitennachweises im Vergleich zum einfachen Blutaussstrich um das ca. 5-20fache (Konzentrationsverfahren im „Dicken Tropfen“).

***Plasmodium falciparum* Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Small trophozoites.
- 2: Gametocytes — normal.
- 3: Slightly distorted gametocyte.
- 4: "Rounded-up" gametocyte.
- 5: Disintegrated gametocyte.
- 6: Nucleus of leucocyte.
- 7: Blood platelets.
- 8: Cellular remains of young erythrocyte.

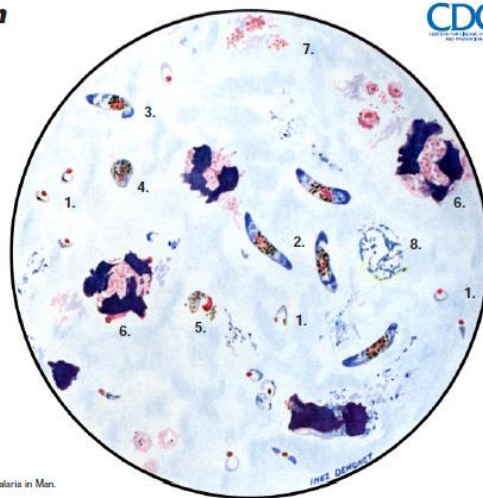


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

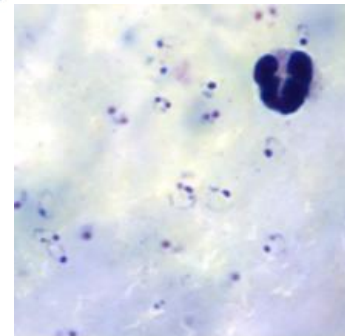


Figure B: Rings of *P. falciparum* in a thick blood smear.

27.3.: Malaria-Schnelltest aus Vollblutproben (Demonstration)

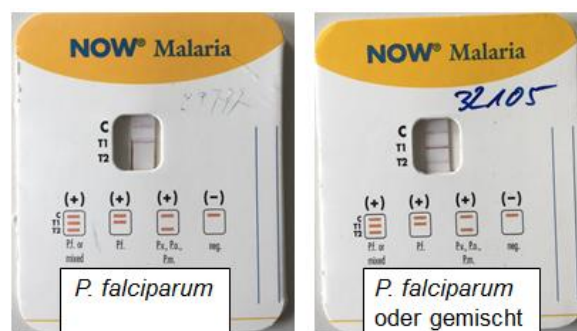
Der Malaria Schnelltest beruht auf dem Prinzip der Immunchromatografie.

Vorteile des Tests:

- schnelles Verfahren (15 min. bis zum Ergebnis)
- geeignet als „point-of-care-Testung“
- sehr sensitiv (96% Sensitivität für *P. falciparum*)

Nachteile des Tests:

- bleibt auch unter Therapie lange positiv (Antigennachweis!)
- erlaubt keine Quantifizierung der Parasitämie

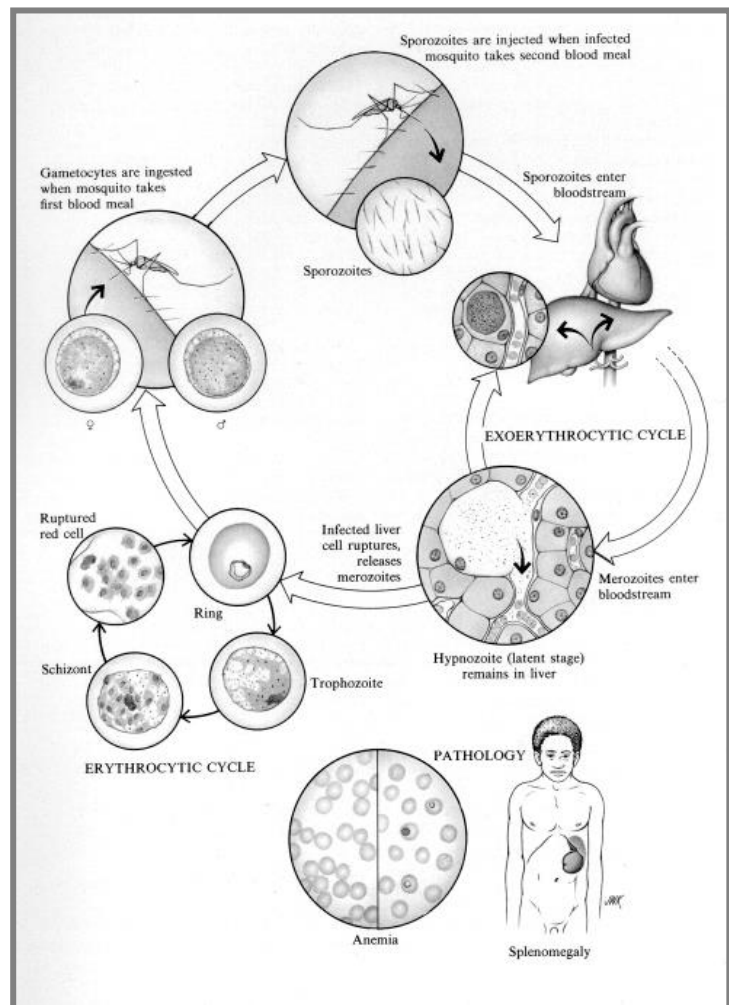


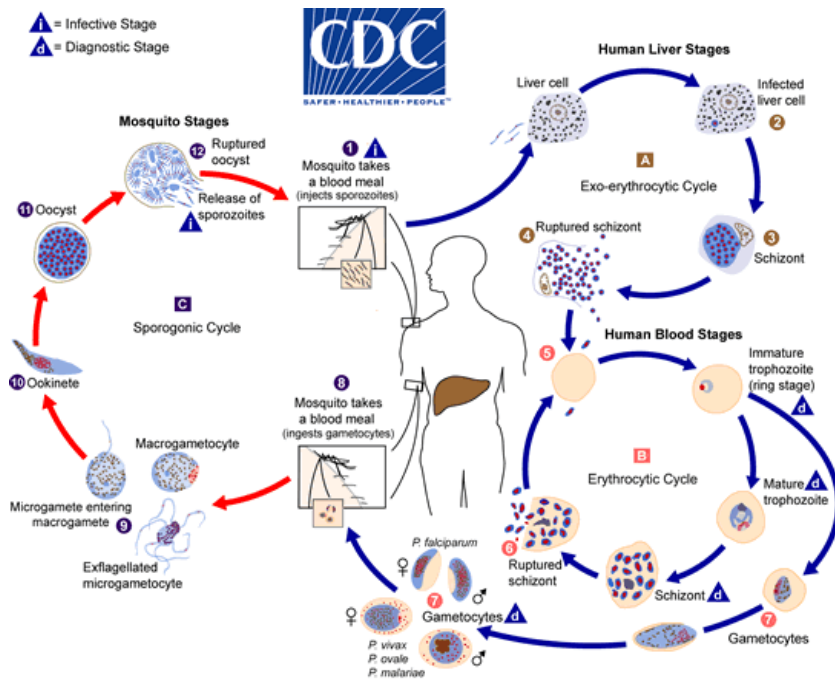
Blutausstriche und „Dicker Tropfen“ an Demonstrationsmikroskopen

Nutzen Sie die voreingestellten Präparate an den Demonstrationsmikroskopen, um unterschiedliche Plasmodienspezies kennen zu lernen.

Die Einstellung bitte nicht verstellen!

Infektionszyklus





The malaria parasite life cycle involves two hosts. During a blood meal, a malaria-infected female *Anopheles* mosquito inoculates sporozoites into the human host ①. Sporozoites infect liver cells ② and mature into schizonts ③, which rupture and release merozoites ④. (Of note, in *P. vivax* and *P. ovale* a dormant stage [hypnozoites] can persist in the liver and cause relapses by invading the bloodstream weeks, or even years later.) After this initial replication in the liver (exo-erythrocytic schizogony A), the parasites undergo asexual multiplication in the erythrocytes (erythrocytic schizogony B). Merozoites infect red blood cells ⑤. The ring stage trophozoites mature into schizonts, which rupture releasing merozoites ⑥. Some parasites differentiate into sexual erythrocytic stages (gametocytes) ⑦. Blood stage parasites are responsible for the clinical manifestations of the disease.

The gametocytes, male (microgametocytes) and female (macrogametocytes), are ingested by an *Anopheles* mosquito during a blood meal ⑧. The parasites' multiplication in the mosquito is known as the sporogonic cycle C. While in the mosquito's stomach, the microgametes penetrate the macrogametes generating zygotes ⑨. The zygotes in turn become motile and elongated (ookinetes) ⑩ which invade the midgut wall of the mosquito where they develop into oocysts ⑪. The oocysts grow, rupture, and release sporozoites ⑫, which make their way to the mosquito's salivary glands. Inoculation of the sporozoites into a new human host perpetuates the malaria life cycle.

Plasmodium falciparum = Malaria tropica

- Siegelringstadien, Doppelbefall häufig
- älterer Trophozoit mit zwei Kernen, befallene Erythrozyten ohne Veränderung
- Schizont, max. 2/3 der Erythrozytengröße, meist nicht im peripheren Blut
- Makrogamont
- Mikrogamont

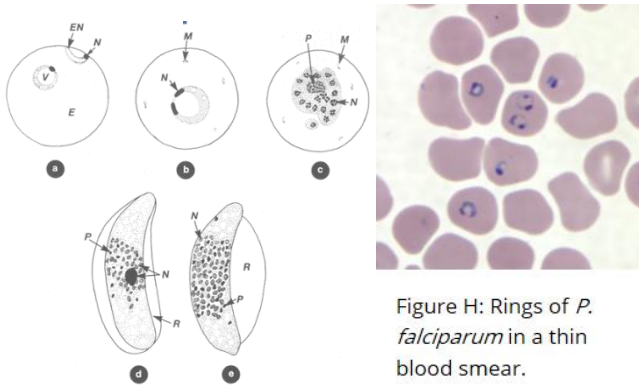


Figure H: Rings of *P. falciparum* in a thin blood smear.

Plasmodium vivax = *Malaria tertiana*

- a. Siegelringform
- b. polymorpher Trophozoit
- c. junger Schizont
- d. älterer Schizont mit zahlreichen (meist 16) Kernen
- e. Makrogamont
- f. Mikrogamont

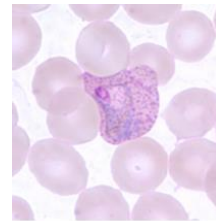
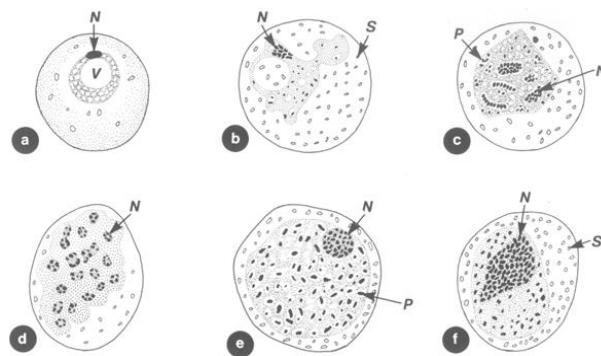


Figure D: Trophozoite of *P. vivax* in a thin blood smear. Note the amoeboid appearance, Schüffner's dots and enlarged infected RBCs.

S Schüffnersche Tüpfelung

N Kern bzw. Chromatinmaterial

P Pigment

V Vakuole

Befallene Erythrozyten können vergrößert und deformiert sein

Plasmodium ovale

- Blutstadien ähneln denen von *P. vivax*
- Erythrozyten sind meist nicht oder nur gering vergrößert
- Schüffnersche Tüpfelung kräftiger u. grobscholliger
- Schizonten meist nur mit 8-10, selten bis zu 16 Merozoiten
- Gamonten sind kleiner als Erythrozyten

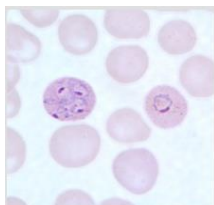


Figure C: Ring-form trophozoites of *P. ovale* in a thin blood smear. Note the multiply-infected RBC in this image.

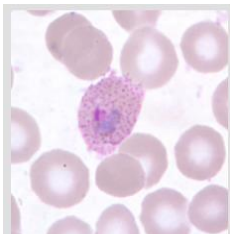


Figure C: Trophozoite of *P. ovale* in a thin blood smear. Note the fimbriation and Schüffner's dots.

Plasmodium malariae = *Malaria quartana*

- einkerniges Siegelringstadium, junger Trophozoit
- junger, bandförmiger Schizont
- reifer Schizont, zentrales Pigment, rosettenartig angeordnete Kerne
- Makrogamont (füllt Erythrozyten fast aus)
- Mikrogamont, bandförmig angeordnetes Chromatin, füllt Erythrozyten nicht aus

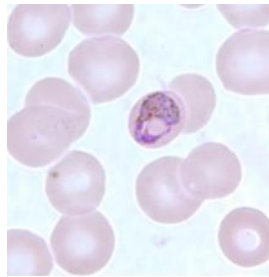
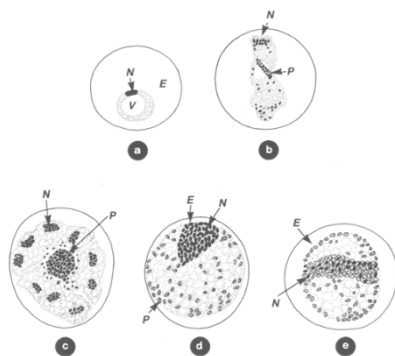


Figure B: Basket-form trophozoite of *P. malariae* in a thin blood smear.

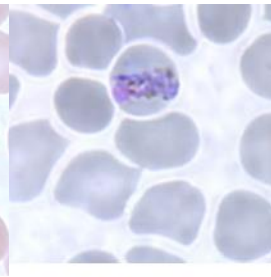


Figure B: Band-form trophozoite of *P. malariae* in a thin blood smear.

- E Erythrozyt
- N Kern bzw. Chromatinmaterial
- P Pigmentgranula
- V Vakuole

Plasmodium knowlesi

Plasmodien-Art, die natürlicherweise bei Makaken in Südostasien vorkommt und auf den Menschen übertragen werden kann (Zoonose).

28.: Untersuchung von Stuhlproben auf Parasiten

Die Diagnostik von parasitären Infektionskrankheiten erfordert das Wissen über die teils sehr komplexen Lebenszyklen, klinischen Verläufe/Manifestationsorte und der Epidemiologie von Parasiten. In der klinischen Anamnese sollten neben den klinischen Symptomen auch Parameter wie eine Reiseanamnese, Essensgewohnheiten, Beruf und Tierkontakte abgefragt werden.

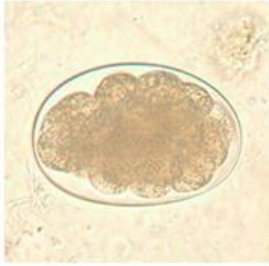
Bei Parasiten des Gastrointestinaltraktes erfolgt die Ausscheidung von Parasitenstadien häufig unregelmäßig und in geringen Konzentrationen. Über Anreicherungsverfahren kann man die Nachweisrate erhöhen. Trotzdem sollten mind. 3 unabhängig voneinander gewonnene Stuhlproben untersucht werden.

28.1.: Nachweis von Parasitenstadien im Stuhl über ein Anreicherungsverfahren

Zielstellung

Lichtmikroskopischer Nachweis von Parasitenstadien in Präparaten aus vorbehandelten Stuhlproben (z.B. Protozoen, Eier von Helminthen).

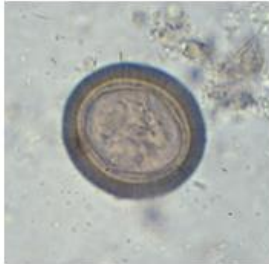
Identifikation nachgewiesener Parasitenstadien anhand phänotypischer Merkmale (Gestalt/Form, Größe, Schalenbau, Farbe, innere Struktur)



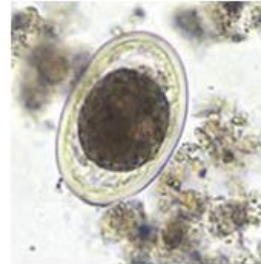
Hakenwurmei



Trichuris trichiura



Taenia sp.

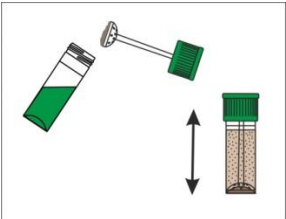

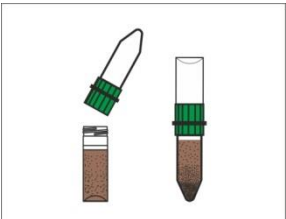
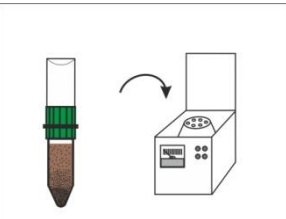
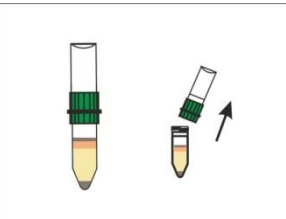


Ascaris lumbricoides

Materialien:

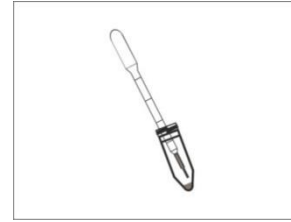
- Mikroskop
- Objektträger
- Deckgläser
- Stuhlprobe
- ParasiTrap®-ECO-System
 - vorgefülltes Arbeitsröhrchen 1 mit Stempel
 - Combi-Medium
 - Arbeitsröhrchen 2 mit integriertem Filter

Durchführung

<p>Schritt 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stempel maximal gestrichen voll mit Stuhlprobe füllen und vorsichtig in das vorgefüllte Arbeitsröhrchen 1 überführen • Arbeitsröhrchen 1 fest verschließen und 1-2 mal schütteln • den Verschluss von Arbeitsröhrchen 1 mit dem leeren Stempel entfernen • Stempel in der Desinfektionslösung entsorgen 	
<p>Schritt 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1,5 ml Combi-Medium hinzugeben. 	
<p>Schritt 3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arbeitsröhrchen 2 mit dem integrierten Filter fest auf das Arbeitsröhrchen 1 schrauben. • Das ganze System um 180° drehen und kräftig auf den Tisch klopfen/schütteln, so dass die Probe vom Arbeitsröhrchen 1 in das Arbeitsröhrchen 2 übergeht. • Das System mit Platznummer beschriften und 1-2 min stehen lassen 	
<p>Schritt 4</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5 min zentrifugieren der gefilterten Suspension bei 1500g. 	
<p>Schritt 5</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nach dem Zentrifugieren stellen sich im Arbeitsröhrchen 2 vier Schichten da. • Die oberen Schichten werden vorsichtig in die Desinfektionslösung entsorgt. • Achtung: Sie benötigen das Sediment! 	

Schritt 6

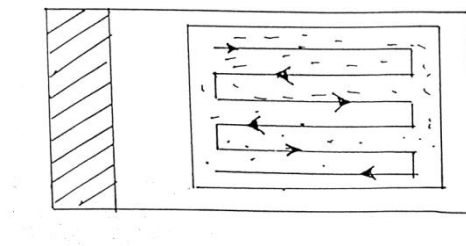
- Gegebenenfalls das Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung resuspendieren.
- Einen Tropfen des resuspendierten Sediments mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglas abdecken.



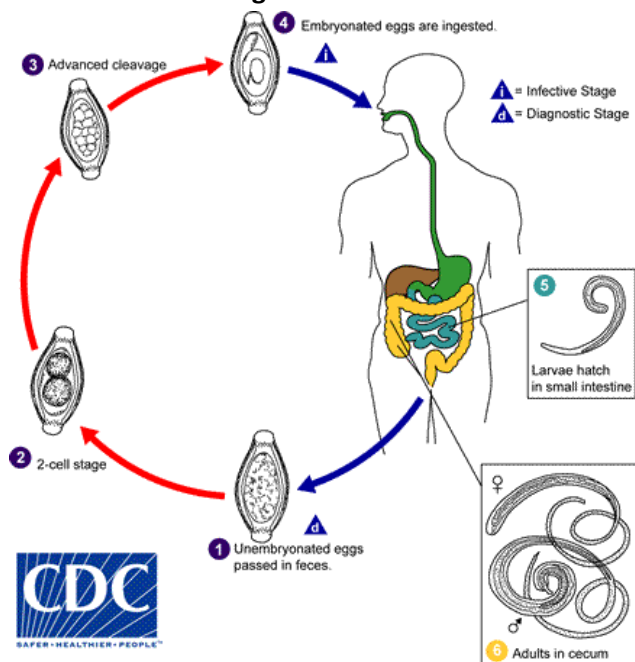
Mikroskopie

- Mit dem 10er Objektiv die mikroskopische Untersuchung beginnen.
- Bei verdächtigen Strukturen zu dem 40er Objektiv wechseln und die Struktur im Detail betrachten.
- Identifizierung von Parasitenstadien anhand phänotypischer Merkmale.
- Präparat nach dem Mäandersystem ca. 8-10 min. lang durchmustern.

Hinweis: Zum Zwecke der kontrastierenden Darstellung dünnchaliger bzw. farbloser Eier einer Durchstrahlung durch angemessene Abblendung vorbeugen.



Beispiel: Lebenszyklus des Peitschenwurms (*Trichuris trichiura*) und die typischen zitronenförmigen Eier, welche im Stuhl ausgeschieden werden.



Aufgabe 28.2.: Direktnachweis von Parasitenstadien in Stuhlaufschwemmungen

Zielstellung

Lichtmikroskopischer Nachweis von Parasitenstadien in Direktpräparaten aus Stuhlaufschwemmungen.

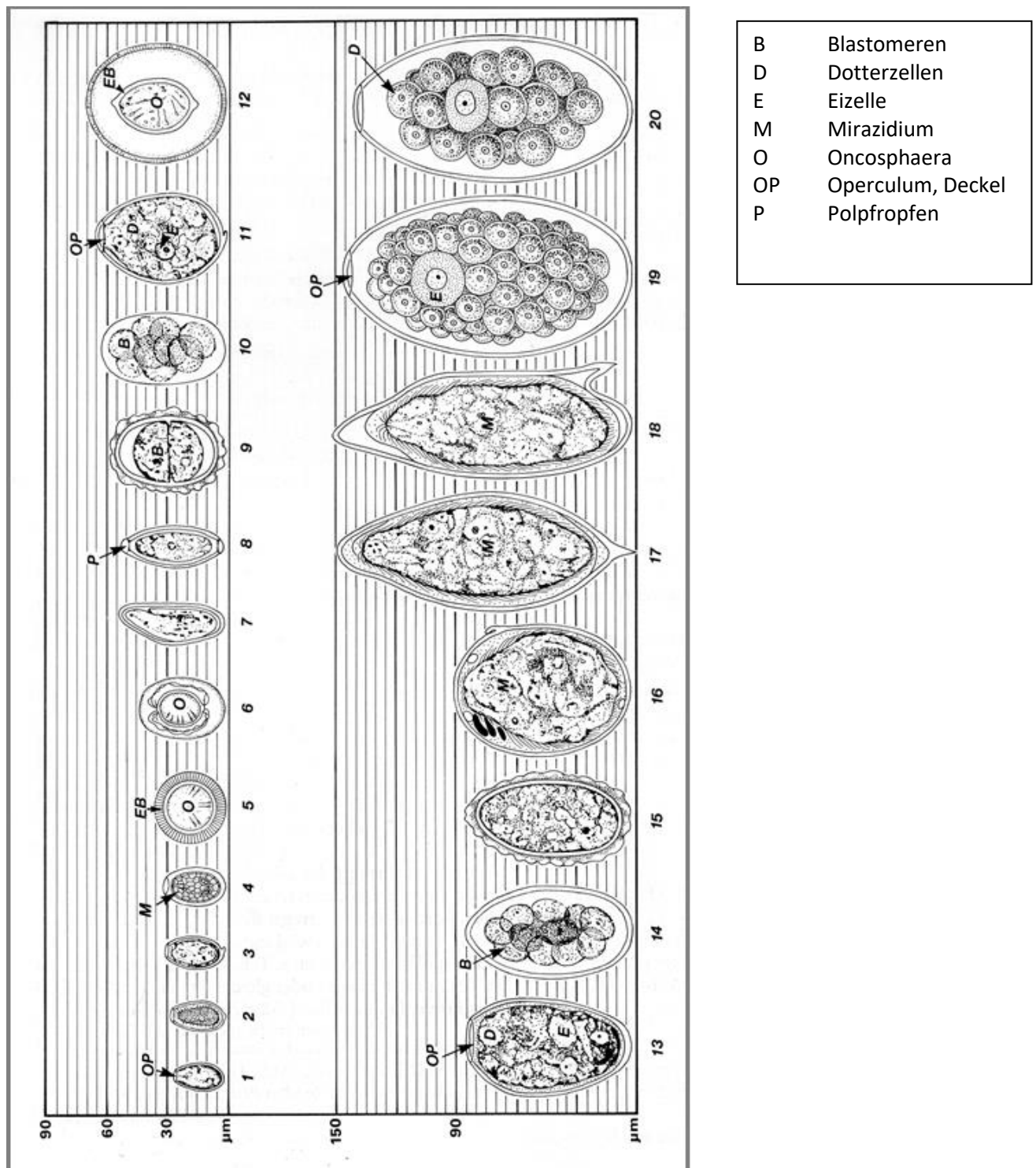
Identifikation nachgewiesener Parasitenstadien anhand phänotypischer Merkmale (Gestalt/Form, Größe, Schalenaufbau, Farbe, innere Struktur).

Materialien:

- Mikroskop
- Objektträger
- Deckgläser
- Stuhlaufschwemmungen

Durchführung

- mit Pasteurpipette Stuhlaufschwemmung suspendieren
- 1 Tropfen der Stuhlaufschwemmung auf einen Objektträger auftragen
- mit Deckglas abdecken
- mit dem 10er Objektiv die mikroskopische Untersuchung beginnen
- bei verdächtigen Strukturen zu dem 40er Objektiv wechseln und im Detail betrachten
- Identifizierung von Parasitenstadien anhand phänotypischer Merkmale (Abgleich mit den Abbildungen auf den folgenden Seiten)



Schematische Darstellung der Eier von 20 wichtigen humanpathogenen Würmern (im Größenvergleich: untere bzw. Mittelwerte; nach Angaben der WHO; verändert). 1: *Metagonimus yokogawai*; 2: *Heterophyes heterophyes*; 3: *Clonorchis sinensis*; 4: *Dicrocoelium dendriticum*; 5: *Taenia*-Arten; 6: *Vampirolepis nana*; 7: *Enterobius vermicularis*; 8: *Trichuris trichiura*; 9: *Ascaris lumbricoides* (befruchtet); 10: *Ancylostoma duodenale* u. *Necator americanus*; 11: *Diphyllobothrium latum*; 12: *Hymenolepis microstoma*; 13: *Paragonimus westermani*; 14: *Trichostrongylus* sp.; 15: *Ascaris lumbricoides* (unbefruchtet); 16: *Schistosoma japonicum*; 17: *Schistosoma haematobium*; 18: *Schistosoma mansoni*; 19: *Echinostoma* sp.; 20: *Fasciolopsis buski* und *F. hepatica*

		Entamoeba histolytica
		Entamoeba coli
		E. hartmanni
		Jodamoeba bütschlii
		Endolimax nana
	-	Dientamoeba fragilis
Trophozoiten	Zysten	

Schematische Darstellung häufiger Amöben im menschlichen Darm in Größenrelation.

Zur Art diagnose wird u. a. die Form und Lage des Kernbinnenkörpers (=Nukleolus) im Kern herangezogen. Die Fortbewegung verläuft in Richtung der dicken Pfeile. BS: Bruchsackpseudopodium (=nur ein Pseudopodium wird ausgebildet); CK: Chromoidalkörper (Reservestoff); E: Erythrozyt des Menschen in einer NV; N: Nukleus, Zellkern; NT: Kern in Teilung; NV, Nahrungsvakuole; PS: Pseudopodium; RV: Reservestoffvakuole (reagiert auf Jodfärbung); ZW: Zystenwand.

Praktikum X

Zusammenfassung
Kurzvorträge