



Instrukcje do ćwiczeń oraz zakres materiału
realizowanego na wykładach z przedmiotu
Mikrobiologia medyczna
na kierunku
biologia

Zakres materiału do egzaminu z przedmiotu mikrobiologia medyczna na kierunku: biologia

1. Endotoksyna: budowa lipo polisacharydu bakteryjnego, produkcja czynników prozapalnych zależna od receptorów tlr4/md2/cd14.
2. Charakterystyka wybranych egzotoksyn: enterotoksyny, hemolizyny, koagulaza, eksfoliatyna (toksyna epidernonekrotyczna), leukocydyna, hialuronidaza, fibrynolizyna, penicylinaza.
3. Mechanizmy działania antybiotyków, a oporność (oporność wrodzona, nabyta, krzyżowa, równoległa), horyzontalny transfer genów
4. Pojęcia: MDR, XDR, PDR
5. Fagoterapia (budowa bakteriofagów, cykl lityczny fagów, wady i zalety zastosowania fagów w terapii przeciwbakteryjnej, mechanizm działania i klasyfikacja litycznych białek fagowych, schemat produkcji rekombinowanych białek fagowych o właściwościach przeciwbakteryjnych).
6. Nanozwiązki srebra (budowa i mechanizm działania, wady i zalety zastosowania nanozwiązków w terapii)
7. Oligopeptydy klasyczne i modyfikowane na przykładzie kolistyny
8. Kompleksy metali (pojęcie kompleksu metali i ich klasyfikacja, wybrane mechanizmy działania na komórki bakteryjne)
9. Zakażenia bakteryjne układu moczopłciowego: charakterystyka bakterii uropatogennych *Escherichia coli* i *Proteus* sp. Pojęcie biofilmu bakteryjnego i jego znaczenie w efektywności terapii przeciwbakteryjnych, wzrost rozpełzliwy i charakterystyka wybranych czynników patogenności bakterii z rodzaju *Proteus*, znaczenie fimbrii w tworzeniu biofilmu wewnątrzkomórkowego przez UPEC.
10. Czynniki patogenności *Pseudomonas aeruginosa* w przebiegu mukowiscydozy: biofilm bakteryjny, antybiotykooporność, produkcja plicjaniny i piowerdyny.
11. Charakterystyka szczepów gronkowców: MRSA, VISA, MRCNS, MSSA, PSSA
12. *Escherichia coli* – podział ze względu na typy serologiczne oraz efekt na organizm człowieka
13. Diagnostyka mikrobiologiczna: wybrane techniki hodowlane, immunochemia, biologia molekularna

Zestawienie tabelaryczne instrukcji do ćwiczeń realizowanych w ramach przedmiotu mikrobiologia medyczna na kierunku biologia

L.p.	Tytuł
1	Omówienie zasad BHP w laboratorium mikrobiologicznym oraz podstaw teoretycznych ćwiczeń. Przygotowanie podłoży bakteryjnych
2	Zastosowanie terapii fagowej na przykładzie faga T4
3	Ocena właściwości bakteriobójczych nanozwiązków
4	Wybrane właściwości biochemiczne bakterii o znaczeniu chorobotwórczym
5	Obserwacja mikro- i makroskopowa bakterii chorobotwórczych – forma pokazowa zajęć

Warunkiem zaliczenia przedmiotu mikrobiologia medyczna jest pozytywna ocena z egzaminu praktycznego z część ćwiczeniowej oraz testowego egzaminu teoretycznego obejmującego zakres materiału zrealizowanego na ćwiczeniach oraz wykładach.

Ćwiczenie nr. 2

Temat: Zastosowanie terapii fagowej na przykładzie faga T4

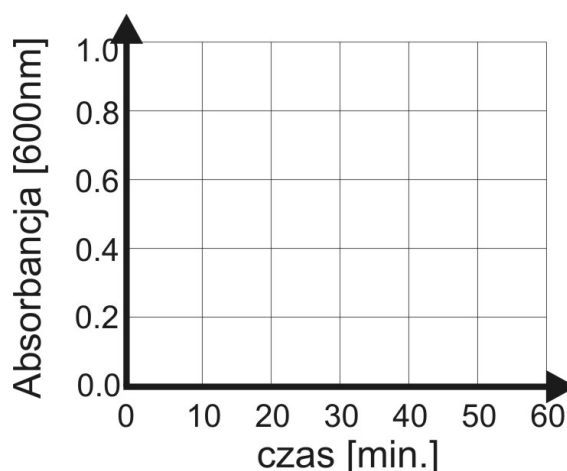
Zagadnienia teoretyczne

1. Budowa bakteriofagów
2. Cykl lityczny i lizogeny bakteriofagów
3. Enzymy fagowe i ich specyfika substratowa: endolizyny i holiny
4. Wady i zalety fagoterapii

Zadania praktyczne

1. Krzywa lityczna

Do kuwety pomiarowej dodać 1 ml zawiesiny bakterii *Escherichia coli* dodać 20 μ l zawiesiny faga T4. Określić spektrofotometrycznie gęstość zawiesiny przy długości fali 600 nm. Następnie zmierzyć absorbancję próbki co 10 min. przez 1 godzinę przy długości fali 600 nm. Wartości absorbancji nanieść na poniższy wykres.



2. Test tyszinkowy

Wylać cienką warstwę agaru LB do szalki Petriego i poczekać aż zastygnie (15 min.). Do jałowej probówki szklanej dodać 100 μ l zawiesiny bakterii *Escherichia coli* oraz 2 ml agaru miękkiego (agar LB ½) schłodzonego do 42°C (łaźnia wodna) oraz 20 μ l zawiesiny faga T4. Po wymieszaniu wylać zawartość probówki do wcześniej przygotowanej szalki z zastygniętym agarem LB, delikatnie rozprowadzić po powierzchni i zostawić do zastygnięcia. Szalki przenieść do ciepłarki.

Piśmiennictwo

1. Niczyporuk J.S., Bartoszcze M. Fagowe enzymy lityczne – nowe nadzieje w walce z zakażeniami bakteryjnymi, Przegląd Epidemiologiczny 2007; 61: 713-721 ([link](#))
2. Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2011, 65: 167-176. ([link](#))

NOTATKI.....

Ćwiczenie nr. 3

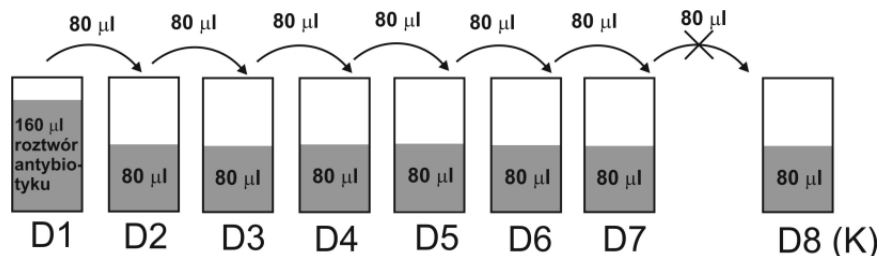
Temat: Ocena właściwości bakteriobójczych nanozwiązków i antybiotyków

Zagadnienia teoretyczne

1. Nanotechnologia w służbie biotechnologii farmaceutycznej
2. Mechanizm działania bójczego nanozwiązków srebra
3. Pojęcia MIC i MBC
4. Typy oporności: nabyta, wrodzona, krzyżowa, równoległa
5. Mechanizmy działania antybiotyków różnych klas, w tym kolistyny

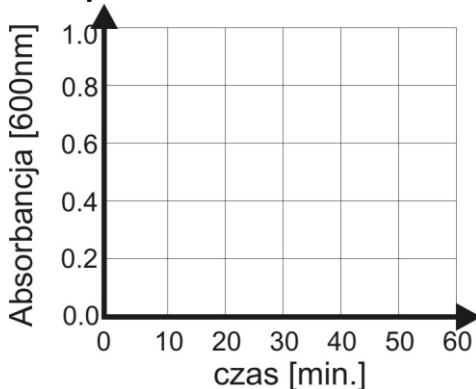
Zadania praktyczne

W 96 dołkowej płytce titracyjnej przygotować szereg rozcieńczeń kolistyny oraz nanokoloidu srebra cząsteczkowego w podłożu LB (metoda seryjnych rozcieńczeń) w 6 powtórzeniach tj. 3 powtórzenia antybiotyku i 3 powtórzenia nanokoloidu według schematu:

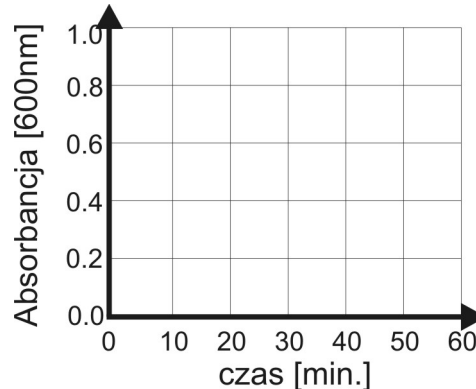


Do 3 szeregów rozcieńczeń antybiotyku dodać po 20 µl zawiesiny bakterii *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* lub *Bacillus subtilis*. Podobnie, do 3 kolejnych szeregów rozcieńczeń nanokoloidu dodać po 20 µl zawiesiny bakterii *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* lub *Bacillus subtilis*. Płytki umieścić w cieplarni w 37°C i zmierzyć absorbancję po 18 h przy długości fali 600 nm. Wartość absorbancji nanieść na wykresy:

Kolistyna



Nanokolid srebra



Piśmiennictwo

1. Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 18
2. Kędziora A, Sobik K. Oporność bakterii na srebro-problem stary czy nowy? Kosmos, 62, 2013, 557-570. ([link](#))

Ćwiczenie nr. 4

Temat: Wybrane właściwości biochemiczne bakterii o znaczeniu chorobotwórczym

Zagadnienia teoretyczne

1. Charakterystyka i klasyfikacja czynników chorobotwórczości
2. Zakażenia oportunistyczne
3. Biofilm bakteryjny, produkcja pirocyaniny i piowerdyny przez *Pseudomonas aeruginosa*
4. Wzrost rozplzliwy bakterii rodzaju *Proteus*, rzęski i fimbrie
5. Hemolizyny bakteryjne
6. Właściwości ureolitycznej bakterii

Zadania praktyczne

1. Ocena produkcji barwników przez biofilm PAO1

Zwirować 72 h biofilm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Proteus mirabilis* (1400 obr./min. 15 min.) i przenieść 200 µl supernatantu do płytek titracyjnych (przeźroczystych i czarnych). Zmierzyć absorbancję przy długościach fal 312 nm, 381 nm i 691 nm (płytki przeźroczyste) oraz fluorescencję 400 nm/420nm (płytki czarne).

2. Wzrost rozplzliwy/obserwacja mikroskopowa „żywych” bakterii

Wykonać punktowy posiew *P. mirabilis* z wklonowanym genem kodującym białko czerwonej fluorescencji na środek szlaku Petriego z podłożem agar LB. Płytkę inkubować 18 h w 37°C. Dodatkowo z przygotowanych zawiesin powyższych bakterii wykonać preparaty mikroskopowe – obserwacja w tzw. „kropki wiszące” w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym. Na szkiełko nakrywkowe nanieść po jednej kulce z plasteliny na każdy z rogów, następnie na środek szkiełka nanieść kroplę hodowli bakteryjnej i od góry przycisnąć szkiełko podstawowe. Cały układ odwrócić według schematu:



3. Właściwości hemolityczne bakterii

Wykonać posiew redukcyjny *E. coli*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* na płytkę krwawą

4. Właściwości ureolitycznej bakterii

Wykonać posiew redukcyjny *E. coli*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* na podłoże Christiansena

Piśmiennictwo

1. Wolska K, Grudniak A.M., Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A. Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych. Postępy Mikrobiologii 2010, 40, 105-114 ([link](#))
2. Różalski A, Kwil I, Torzewska A, Baranowska M, Stączek P. Bakterie z rodzaju *Proteus* - cechy i czynniki chorobotwórczości. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2007; 61: 204-219 ([link](#))
3. Ostrowska K, Strzelczyk A, Różalski A, Stączek P. Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013; 67 1027-1033 ([link](#))

Ćwiczenie nr. 5

Temat: Obserwacja mikro- i makroskopowa bakterii chorobotwórczych – forma pokazowa zajęć

Zagadnienia teoretyczne

1. Podłoża mikrobiologiczne stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej
2. Zasady oceny makro- i mikroskopowej bakterii
3. Metody barwienia komórek bakteryjnych
4. Szereg biochemiczny

Zadania praktyczne

Zajęcia mają charakter demonstracyjny na których zostaną zaprezentowane zabezpieczone wyniki posiewu lub preparaty mikroskopowe:

1. *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* na podłożu Chapmana
2. Bakterie hemolityczne na płytkach krwawych
3. Bakterie odporne na antybiotyki – metoda krążkowo-dyfuzyjna/podłoże Mueller-Hintona
4. Preparaty mikroskopowe biofilmu bakteryjnego *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Proteus mirabilis* O18 z wklonowanym plazmidem niosącym gen kodujący białko czerwonej fluorescencji RFP (obserwacja pod mikroskopem świetlnym; barwienie fioletem krystalicznym oraz fluorescencyjnym)

Piśmiennictwo

1. Szewczyk E.M. Diagnostyka mikrobiologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005
2. Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I. wydanie II rozdział 6,7, 15

Zaliczenie praktyczne ćwiczeń
