

Tematyka ćwiczeń z Mikrobiologii przedmiotu MIKROBIOLOGIA I PARAZYTOLOGIA
I ROK POŁOŻNICTWO, STUDIA I stopnia STACJONARNE

Osoba prowadząca: **dr Krystyna Królikowska**

Ćwiczenia odbędą się w Sali D4, poziom 0, budynek G UJK.

Blok ćwiczeniowy nr 1

Przepisy BHP obowiązujące w laboratorium mikrobiologicznym. Metody sterylizacji i dezynfekcji.
Posiewy i hodowla drobnoustrojów.

Morfologia makroskopowa. Barwienie bakterii – morfologia mikroskopowa.

Oznaczanie lekowrażliwości bakterii.

Mikroflora powietrza.

Materiały do badań mikrobiologicznych. Metodyka higienicznego mycia rąk.

Blok ćwiczeniowy nr 2

Podsumowanie. Interpretacja wyników z bloku ćwiczeniowego nr 1.

Zaliczenie przedmiotu w formie pisemnego testu.

Piśmiennictwo obowiązujące:

1. Różalski A. „Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej”. Skrypt dla studentów biologii.
2. Szewczyk E.M. (red.) „Diagnostyka bakteriologiczna”. PWN 2005.
3. Heczko P.B. (red.) „Mikrobiologia lekarska – przewodnik do ćwiczeń dla studentów wydziału lekarskiego”. Wyd. UJ Kraków.

oraz inne dostępne źródła

I ROK POŁOŻNICTWO, STUDIA I stopnia STACJONARNE - MIKROBIOLOGIA

Blok ćwiczeniowy nr 1

Tematyka:

Przepisy BHP obowiązujące w laboratorium mikrobiologicznym. Metody sterylizacji i dezynfekcji.
Posiewy i hodowla drobnoustrojów.
Morfologia makroskopowa. Barwienie bakterii – morfologia mikroskopowa.
Oznaczanie lekowrażliwości bakterii.
Mikroflora powietrza.
Materiały do badań mikrobiologicznych. Metodyka higienicznego mycia rąk.

Zagadnienia teoretyczne

1. Metody sterylizacji i ich znaczenie w mikrobiologii.
2. Sterylizacja a pasteryzacja.
3. Dezynfekcja i metody dezynfekcji.
4. Definicja i podział podłoży mikrobiologicznych.
5. Rodzaje posiewów i typy hodowli drobnoustrojów.
6. Pojęcie CFU (jednostek tworzących kolonie).
7. Metody liczenia drobnoustrojów.
8. Cechy charakteryzujące morfologię makroskopową bakterii
9. Wzrost bakterii na podłożu stałym i płynnym
10. Sposoby barwienia bakterii
11. Rodzaje barwników stosowanych podczas barwienia drobnoustrojów
12. Pojęcie zdolności rozdzielczej i apertury numerycznej oraz rola olejku immersyjnego w mikroskopii
13. Klasy antybiotyków
14. Mechanizmy działania antybiotyków z różnych grup
15. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki z różnych grup
16. Antybiotyki a chemioterapeutyki
17. Niebezpieczeństwa związane z narastaniem oporności na preparaty przeciwbakteryjne (szcepki wielolekooporne – MDR, gronkowce MRSA, enterokoki VRE, prątki gruzlicy XDR)
18. Powietrze jako środowisko bytowania drobnoustrojów.
19. Czynniki wpływające na liczbę drobnoustrojów w powietrzu.
20. Charakterystyka mikroorganizmów występujących w powietrzu.
21. Sposoby rozprzestrzeniania się drobnoustrojów w powietrzu.
22. Charakterystyka metod badania powietrza – met. sedymentacyjna, met. zderzeniowa (wolumetryczna).
23. Znaczenie mikroorganizmów bytujących w powietrzu szpitali, aptek.
24. Ogólne zasady postępowania dotyczące pobierania materiału do badań mikrobiologicznych.
25. Higiena rąk, zakażenia, dezynfekcja.

Część praktyczna

1. **Sterylicacja podłoży mikrobiologicznych** parą wodną pod zwiększonym ciśnieniem (agar i bulion wzbogacony). Kontrola sterylizacji.

2. **Posiew na bulion wzbogacony.**

Wyżarzyć eżę, ostudzić i pobrać na oczko posiewany materiał (pobrać nieco bakterii z hodowli stałej). Odkorkować probówkę z jałowym bulionem wzbogaconym, opalić jej ujście w płomieniu palnika a następnie zanurzyć oczko ezy w pożywce i energicznie potrząsnąć

3. Posiew redukcyjny na płytce:

Wyżarzyć eżę mikrobiologiczną, wystudzić i pobrać na oczko posiewany materiał. Wykonać posiew wg omawianego schematu.

4. Omówienie czynności związanych z **wykonaniem rozcieńczeń hodowli**.

Uwaga

WSZYSTKIE CZYNNOŚCI WYKONUJEMY PRZY PŁOMIENIU PALNIKA, W STREFIE NIE WIĘKSZEJ NIŻ 25 CM.

5. Przygotowanie preparatów mikrobiologicznych.

Przygotować szkiełko podstawowe (odtłuścić alkoholem i opalić w płomieniu palnika), nanieść na nie kroplę wody destylowanej. Wyżarzoną eżę mikrobiologiczną pobrać nieco bakterii i wykonać rozmaz (powinien być cienki). Rozmaz utrwalić w płomieniu palnika.

6. Barwienie pozytywne.

Pokryj utrwalony rozmaz fuksyną lub fioletem krystalicznym. Inkubuj 2 minuty. Spłucz wodą destylowaną, osusz w bibule. Obserwuj pod imersją.

7. Barwienie bakterii metodą Grama.

Wysuszony rozmaz bakterii barwić wg procedury:

- 1,5 min. fiolet krystaliczny
- 1,5 min. płyn Lugola
- spłukać pod wodą bieżącą, odbarwić i ponownie spłukać
- 8 sek. fuksyna, po czym preparat spłukać wodą

Odczyt wyników

Wykonaj opis morfologii makroskopowej posiewanych bakterii (posiew z poprzedniego ćwiczenia). Zwróć uwagę cechy charakteryzujące typ wzrostu na podłożu płynnym i stałym.

Wykonaj rysunek obrazu mikroskopowego barwionych bakterii, zalicz je do odpowiedniej grupy.

8. Wykonanie **antybiogramu** dla wybranych szczepów bakterii

W jałowej soli fizjologicznej sporządzić zawiesinę badanych bakterii, tak aby uzyskać zmętnienie równe 1° w skali McFarlanda. Następnie za pomocą jałowej wymazówki rozprowadzić zawiesinę dokładnie i jednolicie na powierzchni stałego podłoża Müeller-Hintona. Bezpośrednio po inokulacji umieścić na powierzchni podłoża krążki nasączone antybiotykami/chemioterapeutykami. Należy zwrócić uwagę, żeby każdy krążek miał zapewniony dobry kontakt z podłożem M-H i żeby odległość między poszczególnymi krążkami była nie mniejsza niż 2 cm.

Posiewy inkubować przez 24 h w temp. 37°C.

Odczyt wyników

Zmierzyć wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka nasyconego antybiotykiem. Jest to miara wrażliwości badanego szczepu na dany antybiotyk. Oceny wrażliwości dokonuje się według norm NCCLS M2-A7 ze stycznia 2000r. lub według standardów EUCAST.

Gatunek bakterii	antybiotyk/chemioterapeutyk				
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Proteus vulgaris</i>					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>					

9. **Badanie mikrobiologiczne powietrza metodą sedymentacyjną** (PN-89-Z-04111/02; PN-89-Z-04008/08).

- Oznaczanie ogólnej liczby bakterii – otwarte płytki z agarem wzbogaconym eksponować 10 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 120 cm, następnie zamknąć i inkubować 24 h w temp. 37°C.
- Wykrywanie obecności gronkowców mannitolo-dodatnich – otwarte płytki z podłożem Chapmana eksponować 30 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, zamknąć i inkubować 24–48 h w temp. 37°C.
- Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych na podłożu Sabourauda z chloramfenikolem (PN-89-Z-04111/03) – otwarte płytki z podłożem eksponować 10 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, inkubować co najmniej 3 doby (jeśli nie obserwuje się wzrostu, przedłużyć czas inkubacji do 7 dni) w temp. 26°C.

10. **Badanie mikrobiologiczne powietrza metodą zderzeniową** (próbnik czystości powietrza MikroBio MB1+).

Odczyt wyników

Policzyć ilość kolonii bakterii na podłożach a następnie przeliczyć wg wzoru: $A = \frac{a \times 10^4}{\Pi \times r^2 \times 0,2 \times t}$ gdzie:

A – liczba bakterii /grzybów mikroskopowych w 1m³ powietrza atmosferycznego; a – średnia liczba kolonii na płytkach Petriego; $\Pi \times r^2$ – powierzchnia płytki Petriego (cm²); t – czas ekspozycji (min.); 0,2 – współczynnik przeliczeniowy czasu ekspozycji.

Ilość bakterii na podłożu	Stanowisko					
Agar wzbogacony						
Chapmana						
Agar Sabourauda						

Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego określić wg tablic (PN-89-Z-04111/02 i PN-89-Z-04111/03)

Ogólna liczba bakterii	Liczba gronkowców mannitolo-dodatnich	Stopień zanieczyszczenia powietrza	Ogólna liczba grzybów w 1 m ³ powietrza	Stopień zanieczyszczenia powietrza
poniżej 1000	brak	niezanieczyszczone	od 3000 ÷ 5000	przeciętnie czyste, zwłaszcza w okresie późnowiosennym i wczesnojesiennym
1000 – 3000	25 i poniżej	średnio zanieczyszczone	powyżej 5000 do 10 000	zanieczyszczenie mogące negatywnie oddziaływać na środowisko naturalne człowieka
powyżej 3000	powyżej 25	silnie zanieczyszczone	powyżej 10 000	zanieczyszczenie zagrażające środowisku naturalnemu człowieka

11. **Badanie obecności bakterii na skórze rąk niezdezynfekowanych i odkażonych.**