Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов

медицинский университет»

Кафедра клинической микробиологии

Обсуждено на заседании кафедры

протокол № от\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**ДЛЯ СТУДЕНТОВ**

**для проведения лабораторных занятий по общей микробиологии**

со студентами2 курса фармацевтического факультета

заочной формы получения высшего образования

по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология»

для специальности «1-79 01 08 «Фармация»

Витебск, 2023

**Занятие №1**

Тема: ***Морфология и ультраструктура прокариотов и эукариотов. Физиология и биохимия бактерий.***

**1. Цели и задачи занятия**

1. Ознакомиться с особенностями работы в баклаборатории и техникой безопасности.
2. Научиться правилам обращения с культурами микробов и техникой приготовления мазков.
3. Научиться микроскопировать приготовленные препараты с использованием иммерсионной системы микроскопа.
4. Ознакомиться с отдельными структурами бактериальной клетки в конфокальном микроскопе.
5. Освоить технику посевов и пересевов на чашку с МПА, жидкие и полужидкие питательные среды.
6. Научиться оценивать результаты ферментативной активности бактерий.
7. Ознакомиться с методами культивирования анаэробов.
8. **Вопросы для аудиторного контроля знаний**

 *Морфология и структура бактерий*

1. Принципы таксономии и классификации и микроорганизмов.
2. Основные морфологические формы бактерий.
3. Структура бактериальной клетки (обязательные и необязательные структурные компоненты). Оболочка бактерий, строение.
4. Клеточная стенка бактерий, функции. Различия в строении клеточной стенки Грам+ и Грам- бактерий.
5. Капсула бактерий, ее роль, методы выявления.
6. Споры, их значение, стадии образования, условия для спорообразования, способы выявления.
7. Жгутики. Методы изучения подвижности. Пили, фимбрии. Инжектисома.
8. Нуклеоид, функция, методы выявления.

***Демонстрация:***

* Препараты капсул и спор у бактерий.
* Техника приготовления мазков.
1. **Самостоятельная работа студентов**

Приготовление мазков из бульонной культуры стафилококка, окраска метиленовым синим, микроскопия.

Приготовление мазков из смеси сарцины и кишечной палочки, окраска по Граму, микроскопия.

*Физиология бактерий*

1. Метаболизм бактерий. Автотрофы, гетеротрофы.
2. Голофитный тип питания. Механизмы транспорта питательных веществ у бактерий.
3. Рост и размножение бактерий.
4. Рост микробов в биопленках.
5. Ферменты бактерий, их свойства, классификация, значение
6. Классификация бактерий по типам дыхания.
7. Методы культивирования анаэробов.

***Демонстрация:***

* Методы культивирования анаэробов.
* Техника посевов на различные питательные среды.
1. **Самостоятельная работа студентов**
2. Посев смеси микробов на чашку Петри с МПА.
3. Учет роста на демонстрационной чашке Петри с посевом смеси микробов.
4. Учет биохимических свойств (демонстрация)

# Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа на кафедре микробиологии и в бактериологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, так как исследования проводятся с использованием культур микроорганизмов I-II групп патогенности и инфицированного материала от пациентов.

Соблюдение этих правил необходимо для обеспечения не только личной безопасности, но и безопасности окружающих.

**Запрещается:**

1. Заходить в помещения кафедры микробиологии без спецодежды (халат, шапочка).
2. Работать в учебных лабораториях без необходимой спецодежды (халатов, шапочек, при необходимости – перчаток, масок).
3. Принимать пищу в учебных лабораториях кафедры.
4. Класть на столы или на пол в учебных лабораториях портфели и сумки.

**Перед началом работы студент обязан:**

1. Пройти первичный инструктаж по технике безопасности работы на кафедре микробиологии. В дальнейшем проходить повторный инструктаж по технике безопасности согласно графику проведения инструктажей.
2. Портфели, сумки, пакеты, книги и другие личные вещи положить в предназначенный для личных вещей студентов шкаф.
3. Проверить состояние рабочего стола и микроскопа. О всех обнаруженных недочетах немедленно сообщить своему преподавателю. (Рабочий стол и микроскоп закрепляют за студентом на все время его работы на кафедре).

**Обязанности студентов и дежурных во время лабораторной работы:**

На каждое занятие назначают 1 дежурного из состава группы

1. Дежурный принимает учебный материал от лаборанта кафедры.
2. Во время лабораторной работы необходимо:

1) содержать рабочее место в образцовом порядке и чистоте;

2) бережно обращаться с микроскопом, посудой, инструментами и другими предметами лабораторного оборудования;

3) проявлять максимальное внимание ко всем этапам работы с культурами микроорганизмов I-II групп патогенности.

4) если студент случайно разобьет пробирку с микробами или разольет заразный материал («микробиологическая авария»), он обязан сообщить об этом преподавателю и вместе с ним обеззаразить рабочее место. Перед началом работы студент должен Ознакомитьсяся с «Мероприятиями на случай аварии при работе с патогенными биологическими агентами I-II групп патогенности».

**Обязанности студентов и дежурных по окончании работы:**

1. Привести в порядок рабочее место.
2. Все использованные предметные стекла положить в указанное преподавателем место.
3. Все засеянные пробирки и чашки поставить в термостат.
4. Отработанный материал сдать дежурному для стерилизации.
5. Привести в порядок микроскоп.
6. Обработать руки антисептическим раствором и тщательно вымыть их с мылом.
7. Представить альбом с зарисовками и протокол для подписи преподавателю.
8. Дежурному вменяется в обязанность проверить состояние рабочих столов и устранить дефекты уборки; выключить свет.

I. Этапы приготовления мазков

*1. Приготовление мазка из агаровой культуры*

* На середину обезжиренного предметного стекла нанести петлей каплю физиологического раствора.
* Внести стерильной петлей в каплю физиологического раствора агаровую культуру.
* Равномерно распределить культуру на предметном стекле в виде круга диаметром 1,5-2 см.
* Простерилизовать петлю в пламени.
* Высушить мазок при комнатной температуре или для ускорения – над пламенем спиртовки.
* Зафиксировать мазок в пламени.
* Окрасить мазок.
* Промыть водой.
* Просушить мазок фильтрованной бумагой.
* Нанести на мазок каплю иммерсионного масла.
* Выполнить микроскопию мазка.

*2. Приготовление мазка из бульонной культуры*

* На середину обезжиренного предметного стекла нанести стерильной петлей или стерильной пастеровской пипеткой каплю бульонной культуры и равномерно распределить в виде мазка диаметром 1,5-2 см.
* Остальные этапы те же.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

**Основная:**

1. Лекционный материал.
2. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Общая микробиология» под редакцией проф. И.И. Генералова, 2022
3. Микробиология : учебник. 2-е изд. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022

**Дополнительная:**

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: практикум / Т. А. Канашкова [и др.]. – 6-е изд. – Минск : БГМУ, 2022
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т./ под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021

Доцент Шилин В.Е.

**Занятие №2**

Тема: ***Микробиологические и молекулярно-биологические основы химиотерапии. Методы определения чувствительности микробов к антибиотикам. Микрофлора лекарственного растительного сырья и готовых лекарственных форм. Методы оценки микробиологической чистоты и стерильности лекарственных средств***

**1. Цели и задачи занятия**

1. Учесть результаты своих посевов на чашке Петри.
2. Научиться определять чувствительность микробов к антибиотикам дискодиффузионным методом.
3. Познакомиться с методом Е-теста для определения МПК антибиотика.
4. Научиться определять МПК методом серийных разведений в бульоне.
5. Изучить тест-системы для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.
6. Научиться оценивать результаты гель-тромб-теста с целью обнаружения эндотоксина.
7. Ознакомиться с методикой контроля стерильности в закрытой системе (стеритест).

1. **Вопросы для аудиторного контроля знаний**

***Микробиологические и молекулярно-биологические основы химиотерапии:***

1. Антимикробная химиотерапия. Терапевтический индекс. Антибиотики, определение, требования к антибиотикам.
2. Классификация антибиотиков: по происхождению, характеру и спектру действия. Механизм действия антибиотиков.
3. Антибиотики подавляющие синтез клеточной стенки.
4. Антибиотики действующие на клеточную мембрану.
5. Антибиотики подавляющие синтез белка.
6. Антибиотики нарушающие синтез нуклеиновых кислот.
7. Сульфаниламиды, триметоприм.
8. Побочные эффекты использования антимикробных препаратов.
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (МИК, МБК).
10. Диффузионные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (дискодиффузионный метод и Е-тест).
11. Методы серийных разведений определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Автоматизированные методы.
12. Механизмы развития лекарственной устойчивости. Генотипическая и фенотипическая устойчивость к антибиотикам. Профилактика распространения антибиотикоустойчивости микроорганизмов.
13. **Самостоятельная работа студентов**.

1. Учет чувствительности стафилококка к антибиотикам дискодиффузионным методом.

2. Учет чувствительности E.coli к доксициклину методом серийных разведений.

**Демонстрация:** Е-тест, планшет с тест-системой для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

***Методы оценки микробиологической чистоты и стерильности лекарственных средств***

1. Источники и причины микробного загрязнения лекарственного растительного сырья и готовых лекарственных средств. Признаки микробной порчи лекарственных форм и меры ее предупреждения.
2. Определение микробной загрязненности лекарственных средств и способы устранения их антимикробного действия.
3. Определение стерильности инъекционных растворов. Пирогены. Эндотоксины как причина пирогенности инъекционных растворов. Гель-тромб-тест для обнаружения эндотоксина.
4. Методы оценки микробиологической чистоты и стерильности лекарственных средств. Микробиологический контроль воды для инъекций.

**Демонстрация** определения стерильности лекарственных средств в системе «стеритест».

1. **Самостоятельная работа студентов**

Учет результатов гель-тромб-теста для обнаружения эндотоксина.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

**Основная:**

1. Лекционный материал.
2. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Общая микробиология» под редакцией проф. И.И. Генералова, 2022
3. Микробиология : учебник. 2-е изд. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022

**Дополнительная:**

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: практикум / Т. А. Канашкова [и др.]. – 6-е изд. – Минск : БГМУ, 2022
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т./ под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021

Доцент Шилин В.Е.

**Занятие №3**

Тема: ***Иммунитет. Виды и системы иммунитета. Иммунокомпетентные клетки. Цитокины. Антигены, антитела, серологические реакции. Механизмы развития иммунного ответа***

**1. Цели и задачи занятия**

1. Ознакомиться с методикой постановка реакции кольцепреципитации.
2. Научиться учитывать результаты РПГА и делать заключение.
3. Освоить постановку реакции агглютинации на стекле.
4. Научиться оценивать результаты ИФА для определения антител в сыворотке пациентов.
5. Ознакомиться с мазками с РИФ в конфокальном микроскопе.

**2. Вопросы для аудиторного контроля знаний**

1. Определение понятия «иммунитет», виды и феномены иммунитета, «иммунологическая память».
2. Структура системы иммунитета: центральные и периферические органы, подсистемы.
3. Центральные понятия системы иммунитета: антигены, антитела, рецепторы, цитокины.
4. Цитокины: общие свойства, классификация.
5. Интерлейкины.
6. CD-молекулы.
7. Лимфоидная система: субпопуляции Т- и В- лимфоцитов, функции.
8. Антигены: определение, свойства, виды.
9. Основные бактериальные антигены, характеристика. Суперантигены.
10. Неинфекционные антигены, виды. HLA-система.
11. Иммуноглобулины: определение, структура.
12. Классы иммуноглобулинов, характеристика.
13. Антитела: виды, механизмы действия.
14. Серологические реакции: общая характеристика, назначение.
15. Реакция преципитации, виды, ингредиенты, цель постановки.

о ходе самостоятельной работы.

1. Реакция агглютинации: ингредиенты, ее виды, назначение.
2. РПГА: ингредиенты, назначение.
3. РИФ, виды, ингредиенты.
4. ИФА, ингредиенты, цель постановки, учет реакции.

**3. Самостоятельная работа студентов**

1. Постановка ориентировочной реакции агглютинации на стекле с целью определения вида микроба.
2. Постановка реакции преципитации с целью определения видовой принадлежности белка.
3. Учет демонстрационной РПГА для обнаружения антител в сыворотке пациентов.
4. Учет демонстрационной ИФА для обнаружения антител в сыворотке пациентов.

**Демонстрация** препаратов с РИФ в конфокальном микроскопе.

**Разбор биопрепаратов**: преципитирующие сыворотки, антитоксическая противостолбнячная сыворотка, столбнячный анатоксин, аггл. сыв. брюшнотиф., диагностикум брюшнотиф., эритроцитарный брюшнотиф. Vi-диагностикум.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

**Основная:**

1. Лекционный материал.
2. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Общая микробиология» под редакцией проф. И.И. Генералова, 2022
3. Микробиология : учебник. 2-е изд. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022

**Дополнительная:**

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: практикум / Т. А. Канашкова [и др.]. – 6-е изд. – Минск : БГМУ, 2022
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т./ под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021

Доцент Шилин В.Е.

**Занятие №4**

Тема: ***Оценка иммунного статуса. Иммунопатология. Иммунодефициты. Аллергия, аутоиммунные реакции. Аллергены. Кожно-аллергические пробы. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии.***

**1.Цели и задачи занятия**

1. Научиться оценивать результаты ИФА для определения антител IgE в сыворотке пациентов при аллергии 1 типа.
2. Ознакомиться с вопросами медицинской этики и деонтологии при испытании вакцин и других биопрепаратов.
3. Изучить биопрепараты по теме занятия.
4. **Вопросы для аудиторного контроля знаний:**

1. Иммунопатология: определение, виды. Виды гиперчувствительности, характеристика. Типы гиперчувствительности по Геллу-Кумбсу.
2. Аллергия, определение, общая характеристика. Стадии развития. Аллергены.
3. Механизмы анафилактических реакций I типа.
4. II тип – цитотоксические реакции.
5. III тип - иммунокомплексные реакции.
6. V тип – антирецепторные реакции.
7. IV тип – Гиперчувствительность замедленного типа. Кожные пробы.
8. Иммунодефициты, виды. Примеры первичных иммунодефицитов.
9. Вторичные иммунодефициты. Причины вторичных иммунодефицитов.
10. Иммунодиагностика, иммунный статус, общая характеристика.
11. Характеристика лейкоцитов. Определение различных субпопуляций.
12. Характеристика Т- и В-лимфоцитов, оценка функциональной активности.
13. Характеристика системы гранулоцитов и моноцитов. Оценка фагоцитоза.
14. **Разбор биопрепаратов**.
15. **Самостоятельная работа студентов.**
* Учет ИФА для определения антител IgE в сыворотке пациентов при аллергии 1 типа.
1. **ЭКЗАМЕН ПО ПРАКТИЧЕСКИМ НАВЫКАМ**
* **Студенты должны ознакомиться с описанием препаратов по учебному пособию «Бактерийные и вирусные препараты», авторы Зубарева И.В. и др., 2010, а также знать назначение всех нижеперечисленных препаратов.**
* **Знать механизм и назначение реакций: агглютинации, пассивной гемагглютинации (РПГА), преципитации, иммуноферментного анализа (ИФА), иммунной флюоресценции (РИФ, прямой и непрямой метод).**

**Вакцины**

1. Вакцина АКДС
2. Столбнячный анатоксин
3. Вакцина БЦЖ
4. Живая сибиреязвенная вакцина (СТИ)
5. Антирабиическая культуральная инактивированная вакцина
6. Вакцина против клещевого энцефалита культуральная инактивированная
7. Полиомиелитная культуральная инактивированная вакцина
8. НВs-вакцина
9. КПК-вакцина
10. Гриппол

# Сыворотки для профилактики и лечения

1. Противостолбнячная сыворотка «Диаферм»
2. Противоботулиническая поливалентная сыворотка
3. Антирабический гамма-глобулин
4. Сибиреязвенный глобулин
5. Антистафилококковый гамма-глобулин

# Аллергены

1. Тулярин
2. Бруцеллин
3. Сухой очищенный туберкулин ППД

**Диагностические препараты**:

1. Поливалентная эшерихиозная ОКВ-сыворотка
2. Агглютинирующая эшерихиозная сыворотка, тип 26
3. Агглютинирующая брюшнотифозная сыворотка
4. Агглютинирующая сальмонелезная О-сыворотка, рецептор 9
5. Сыворотка, преципитирующая белок человека
6. Эритроцитарный брюшнотифозный Vi-диагностикум
7. Брюшнотифозная люминесцирующая сыворотка
8. Антиглобулиновая люминесцирующая сыворотка против глобулинов кролика
9. Антиглобулиновая сыворотка против глобулинов человека, меченая ферментом
10. Колибактерин
11. Агглютинирующая дизентерийная сыворотка Зонне
12. Агглютинирующая дизентерийная сыворотка Флекснера

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

**Основная:**

1. Лекционный материал.
2. «Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Общая микробиология» под редакцией проф. И.И. Генералова, 2022
3. Микробиология : учебник. 2-е изд. В. В. Зверев, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022

**Дополнительная:**

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: практикум / Т. А. Канашкова [и др.]. – 6-е изд. – Минск : БГМУ, 2022
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т./ под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021

Доцент Шилин В.Е.