Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Лужанин Владимир Геннадиевич
Должность: исполняющий обязанности ректора
Дата подписания: 11.04.2022 09:26:26
Уникальный программный ключ:
4f6042f92f26818253a667205646475b93807ac6

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация, ПО ИЗУЧЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Составитель(и): В.В. Новикова, А.А. Бобылева, О.В. Рябова

Лабораторное занятие №1

Тема: **МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. ОСНОВНЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ.

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: изучить правила работы в микробиологической лаборатории. Изучить систематику и номенклатуру микроорганизмов, морфологические особенности кокковидных, палочковидных и извитых форм бактерий. Освоить микроскопический метод исследования с иммерсионной системой.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Устройство и оснащение микробиологической лаборатории.
2. Систематика и номенклатура микроорганизмов. Морфологические группы бактерий. Отличие прокариотов от эукариотов.
3. Структура бактериальной клетки. Характеристика обязательных структур.

Микроскопический метод исследования. Правила работы с иммерсионной системой и её преимущества.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Выписать: а) обязательные органоиды микробной клетки
   б) необязательные (дополнительные) органоиды микробной клетки
2. Перечислить особенности строения клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, нуклеоида.
3. Зарисовать в тетрадь схему строения бактериальной клетки.
4. Составить таблицу по истории микробиологии, периодам ее развития, и отразить роль ученых, внесших наибольший вклад в развитие микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология/ Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
2. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова. - М.: Медицина, 1994. – 288 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина – 1988. -208 с.
4. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории.

Оснащение:

1) таблица «Правила работы в микробиологической лаборатории»

2. Ознакомиться с устройством микроскопа.
Оснащение:
1) микроскоп,
2) таблица "Устройство микроскопа".

Методика

Изучить устройство светового микроскопа, выделяя:
а) механическую часть, включающую штатив, состоящий из основания и тубусодержателя, тубус, предметный столик, систему винтов, револьвер;
б) оптическую часть, представленную объективами, окуляром (окулярами) и осветительной системой, которая в свою очередь состоит из расположенных под предметным столиком конденсора, диафрагмы и встроенного осветителя.

3. Освоить технику работы с иммерсионной системой микроскопа.
Оснащение:
1) микроскоп,
2) иммерсионное масло,
3) готовый окрашенный препарат

Методика

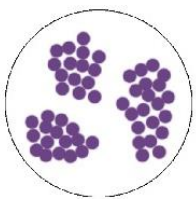
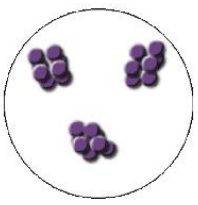
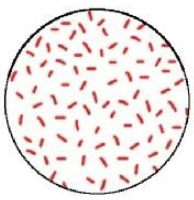
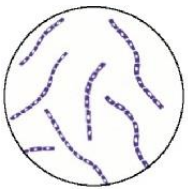
На готовый препарат нанести каплю иммерсионного масла, поместить препарат на предметный столик. С помощью макровинта ввести объектив в масло, далее, осторожно крутя макровинт, добиться появления изображения. Затем, действуя микровинтом, улучшить качество изображения.

4. Посмотреть под иммерсией демонстрационные препараты и зарисовать в рабочую тетрадь.
Оснащение:
1) микроскоп
2) иммерсионное масло
3) 4 препарата разных морфологических групп бактерий
4) таблицы: "Основные формы бактерий"
"Извитые формы бактерий"
"Круглые формы бактерий"
5) слайды по морфологии кокковидных, палочковидных и извитых форм бактерий
6) мультимедийный проектор, ноутбук.

Методика

Промикроскопировать предложенные микропрепараты в иммерсионной системе, описать морфологию бактерий (определить форму, размер и расположение микроорганизмов), зарисовать в рабочую тетрадь.

1. 2. 3. 4.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Правила работы в микробиологической лаборатории.

2. Микроскопический метод исследования:
- устройство светового микроскопа
- иммерсионная система микроскопии
3. Морфологические особенности бактерий: кокковидных, палочковидных и извитых.

1. Правила работы в микробиологической лаборатории:

1. В помещении лаборатории необходимо работать в санитарной одежде (белый халат, шапочка, сменная обувь).
2. Нельзя вносить посторонние вещи.
3. Категорически запрещается прием пищи и курение.
4. С живыми бактериальными культурами необходимо работать с соблюдением всех правил предосторожности: работать сидя, не разговаривать на посторонние темы, не совершать резких движений.
5. При попадании исследуемого материала на стол, одежду, обувь и т.д. необходимо произвести дезинфекцию.
6. В целях противопожарной безопасности надо знать, где находятся средства пожаротушения и уметь ими пользоваться.
7. Соблюдать чистоту и аккуратность в работе, по окончании работы убрать рабочее место, руки вымыть с мылом, обработать дезинфицирующим раствором.
8. Обсудить и записать в альбом, расписаться в журнале за инструктаж по технике безопасности.

2. Микроскопический метод исследования - это изучение под микроскопом окрашенных препаратов из исследуемого материала:

Достоинства:
- быстрый;
- ранний

Недостатки:
- неточный (ориентировочный)

Световой микроскоп состоит из частей:

механической
предназначена для устойчивости прибора, удобства пользования:
- подставка (ножка)
- тубусодержатель
- тубус
- револьвер
- предметный столик
- макровинт
- микровинт

оптической
предназначена для освещения и увеличения объектов:

Осветительный аппарат
находится под предметным столиком
- зеркало плосковогнутое (при искусственном освещении используется вогнутая сторона зеркала)
- диафрагма (регулирует объем светового пучка)
- конденсор (в фокусе конденсора собираются параллельные лучи света)

Для увеличения:
- объективы: малый ×8
  большой ×40
  иммерсионный ×90
- окуляры: ×7, ×10, ×15 раз

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра.

Разрешающая способность микроскопа определяется размером наименьшего объекта, который можно увидеть в данный микроскоп. Для световых микроскопов разрешающая способность – 0,2 мкм, для электронного - в 100-1000 раз выше.

Системы микроскопии

Сухая	***Иммерсионная***
- между объектом и объективом находится воздух; - используется для изучения относительно крупных биологических объектов; - максимальное увеличение объектива ×40; - создает недостаточную освещенность, т.к. луч света проходит через неоднородную среду стекло-воздух,коэффициенты преломления которых составляют 1,51 и 1,0, в результате чего происходит преломление и отклонение лучей света.	- между объектом и объективом находится жидкость (масло); - используется для изучения более мелких биологических объектов; - увеличение объектива ×90; - достигается лучшая освещенность, т.к. иммерсионное масло и стекло имеют практически одинаковый коэффициент преломления лучей света (1,51 и 1,51), что создает однородную среду, в которой рассеивания лучей света не происходит.

<u>Преимущества иммерсионной системы</u>

1. Большее увеличение.
2. Лучшая освещенность за счет создания однородной среды для прохождения лучей света с помощью иммерсионного масла.

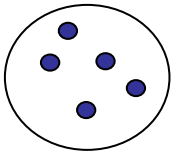
3. Морфология бактерий

Бактерии - это домен (надцарство) одноклеточных (исключение актиномицеты и нитчатые цианобактерии) прокариотных (безъядерных) организмов. Они видны в световой микроскоп, размеры их измеряются в микрометрах. Бактерии растут на искусственных питательных средах, размножение преимущественно происходит бинарным делением. Микроорганизмы, в том числе и бактерии, принято делить на группы:

- <u>непатогенные</u> (сапрофиты) - не вызывают заболеваний
- <u>патогенные</u> (паразиты) - вызывают болезни человека, животных, растений-
- <u>условно-патогенные</u> - вызывают заболевания при определенных условиях.

Морфология - это форма, размер бактерий, расположение клеток в препарате. Выделяют три основные морфологические формы бактерий:

1) кокки

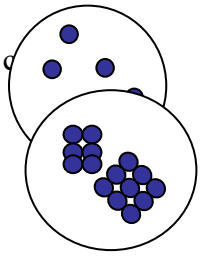


2) палочки

3) извитые

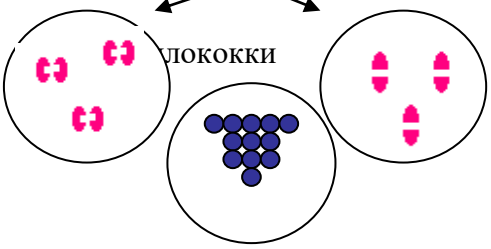
1. *Кокки*: форма - круглая
размер - мелкие
расположение в препаратах - 6 разновидностей:

а) микрококки

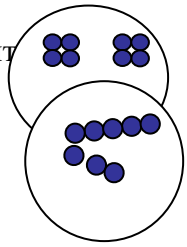


б) диплококки

гонококки пневмококки



в) тетракокки



г) ф лококки

д) стрепт

2. *Палочковидные*:

- форма - цилиндр
- размер: *длина*: *толщина*:

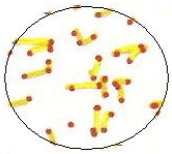
- крупные - толстые
- средних размеров - тонкие
- мелкие

- концы палочек

закругленные (кишечная палочка)

прямые (сибиреязвенная палочка)

- в виде утолщения (дифтерийная палочка)

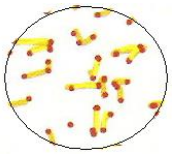


- расположение:

беспорядочное (кишечная палочка, сальмонеллы)

в цепочку (стрептобактерии)

в виде римских цифр II, V, X

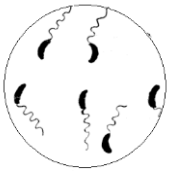


попарно (диплобактерии)

3. *Извитые*: форма – спиралевидная:

- спириллы, спирохеты

- кампилобактерии, вибрионы



Лабораторное занятие №2

Тема: **МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**
СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ОКРАСКИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИИ

Продолжительность занятия: 3 часа
Цель занятия: 1. Закрепить теоретические знания по особенностям строения бактериальной клетки и методам выявления ее отдельных компонентов (наличие капсул у бактерий в препаратах, окрашенных методом Бурри-Гинса; наличие спор у бактерий в препаратах окрашенных по Цилю-Нильсену; наличие жгутиков у бактерий методом «раздавленной» и «висячей» капли);
2. Освоить методику приготовления препаратов из культур с жидких и плотных питательных сред и окраски их простыми и сложными методами; научиться окрашивать мазки по Граму, дифференцировать микроорганизмы по морфологическим и тинкториальным свойствам.

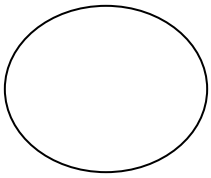
ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1 Структурные элементы бактериальной клетки (основные и дополнительные). Характеристика дополнительных структур и методов их выявления.
2. Особенности строения актиномицетов, спирохет, риккетсий, хламидий, микоплазм.
3. Этапы приготовления окрашенных препаратов.
4. Простые и сложные методы окраски.

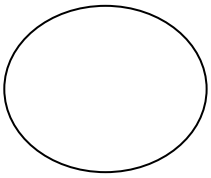
САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Перечислить этапы приготовления мазков и этапы окрасок и простыми и сложными (по Граму) методами, этапы приготовления препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля».
2. Выписать, какие структуры или свойства микробов определяются при окраске по Граму, по Цилю-Нильсену, по Бурри-Гинсу, при микроскопии в тёмном поле препаратов «раздавленная капля» и «висячая капля».
3. Зарисовать морфологию прокариотов:

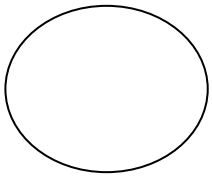
Спирохеты:



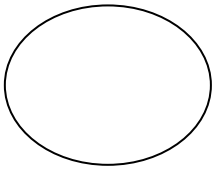
Трепонемы



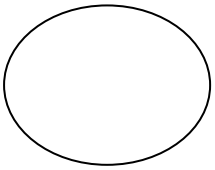
Боррелии



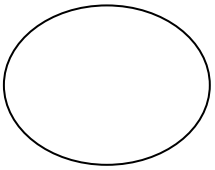
Лептоспиры



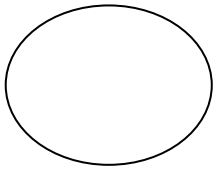
Актиномицеты



Хламидии



Микоплазмы



Риккетсии

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология/ Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
2. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова. - М.: Медицина, 1994. – 288 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина – 1988. -208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить мазок из чистой культуры, окрасить простым методом.

Оснащение:

1) обезжиренные предметные стекла,
2) бактериологическая петля,
3) спиртовка, спички,
4) восковой карандаш,
5) пробирки с культурой антракоида на жидкой питательной среде,
6) колба с водой,
7) водный раствор метиленовой сини Леффлера,
8) белые фильтровальные бумажки,
9) иммерсионное масло,
10) микроскоп.

Методика

Соблюдая правила асептики, приготовить мазок из чистой культуры антракоида, выращенной на жидкой питательной среде: с помощью бактериологической петли поместить каплю культуры на предметное стекло, распределить. Высушить препарат, зафиксировать**.** Окрасить простым методом – поместить 2-3 капли водного раствора метиленового синего на мазок на 3-5 мин., затем промыть водой, удалить фильтровальной бумагой остатки жидкости. Промикроскопировать в иммерсии, зарисовать.

2. Приготовить мазок из смеси двух бактериальных культур: грамположительной (белый стафилококк) и грамотрицательной (кишечная палочка), окрасить по Граму, изучить под иммерсией, зарисовать.

Оснащение:

1) культура белого стафилококка на плотной питательной среде,
2) культура кишечной палочки на плотной питательной среде,
3) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
4) бактериологическая петля,
5) предметные стекла,

6) спиртовка, спички,

7) бумажки, пропитанные генциановым фиолетовым (для окраски по модификации Синева),

8) колба с водой,

9) фильтровальная бумага,

10) раствор Люголя,

11) бюкс с этанолом,

12) водный раствор фуксина Пфейфера,

13) таблицы: - «Метод Грама», «Методика окраски по Граму».

15) микроскоп, иммерсионное масло

Методика приготовления и окраски мазка по Граму (модификация Синева)

Соблюдая правила асептики, приготовить мазок из чистых культур кишечной палочки и белого стафилококка, выращенных на плотных питательных средах: с помощью бактериологической петли поместить каплю физраствора на предметное стекло, затем поместить в каплю соответствующие культуры, распределить. Высушить препарат, зафиксировать**.**

Окраска:

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную генциановым фиолетовым на 2-3 мин.
2. Краску сливают, удаляют фильтровальную бумагу пинцетом и, не смывая водой, наливают раствор Люголя (I в KI)
3. Сливают раствор Люголя и, не смывая водой, препарат помещают в стаканчик с этанолом 2-3 раза или помещают 1-2 капли этанола на 30 секунд, после чего быстро смывают водой.
4. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином 2 мин.
5. Краску смывают, промывают водой до тех пор, пока струи воды не станут бесцветными.
6. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и исследуют с иммерсионной системой.

Результаты: грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в красный (розовый).

3. Зарисовать в рабочую тетрадь микроскопическую картину капсульных бактерий при окраске по методу Бурри-Гинса и микроскопическую картину спор, окрашенных по методу Циля-Нильсена.

Оснащение:

1) таблицы: - «Капсулы у бактерий»

2) таблицы: - «Споры у бактерий»

3) слайды: - «Капсулы», «Окраска по Гинсу-Бурри»

4) слайды: - «Споры у бактерий»

- «Столбнячная палочка, споры»

5) мультимедийный проектор, ноутбук.

4. Определить подвижность бактерий методами "висячей" и "раздавленной" капли.

Оснащение:

1) пробирка с чистой культурой подвижных микроорганизмов (*E. coli*),

2) бактериологическая петля,
3) предметные стекла,
4) предметные стекла с лунками,
5) покровные стекла,
6) вазелиновое масло,
7) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
8) спиртовка, спички,
9) микроскоп, иммерсионное масло

Методика

Метод «висячей капли». Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной культуры, выращенной на жидкой питательной среде, или наносят петлей каплю физиологического раствора, в которую помещают культуру с плотной питательной среды. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно висеть над лункой, не касаясь ее дна или края (рис.1). Препарат изучают в сухой системе микроскопии, используя объектив, увеличивающий в 40 раз при опущенном конденсоре.

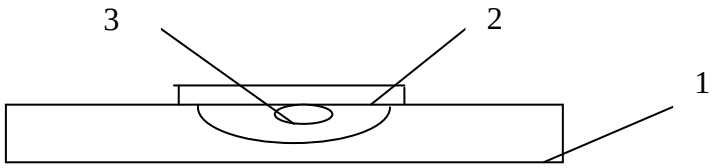


Рис. 1. Препарат «Висячая капля»: 1- предметное стекло с углублением в центре, 2 – покровное стекло, 3 – капля суспензии микроорганизмов.

Метод «раздавленной» капли. На поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю бактериальной культуры, выращенной на жидкой питательной среде, или наносят петлей каплю физиологического раствора, в которую помещают культуру с плотной питательной среды. На каплю помещают покровное стекло. Капля должна быть небольшой, не выходящей за край покровного стекла, излишки жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Микроскопируют препарат, используя объектив, увеличивающий в 40 раз.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Этапы приготовления мазка.
2. Методика и механизм окраски по методу Грама.
3. Методы выявления капсул, спор, жгутиков.

1. Этапы приготовления мазка

1. Приготовление мазка

1) с жидкой питательной среды культуру берут петлей и каплю наносят непосредственно на стекло (без воды)

2) с плотной питательной среды на предметное стекло наносят небольшую каплю воды, в которой эмульгируют исследуемый материал

и распределяют по площади около 2 $см^2$.

2. Высушивание

на воздухе — высоко над пламенем спиртовки мазком вверх

3. Фиксация

Цель: - прикрепить микробов к стеклу
- обезвредить патогенные микробы
- убитые микробы лучше окрашиваются

Методы

<u>физический</u>
- над пламенем спиртовки мазком вверх (3 раза круговыми движениями)

<u>химический</u>
- более щадящий по сравнению с физическим: мазок погружают в фиксатор (этанол, ацетон, формалин и др.) на определенное время

4. Окраска. Методы

<u>простые</u>
(ориентировочные)

1) окрашивают одним красителем анилинового ряда - основным или кислым: - кислый фуксин
-эозин
- метиленовый синий
- генциановый фиолетовый
2) используются для изучения морфологии микроорганизмов

<u>сложные</u>
(дифференцирующие)

1) используют несколько красителей (основная и вспомогательная краски), обесцвечивающие жидкости (спирты, кислоты и др.).
2) используются для изучения морфологии и ультраструктуры микробных клеток
Основные методы:
- Грама (определение типа клеточной стенки)
- Бурри-Гинса (выявление капсул)
- Циля-Нильсена (определение кислотоустойчивости бактерий, выявление спор)
- Ожешко (выявление спор) и др.

Краситель наливают на поверхность мазка на определенное время, затем мазок промывают до тех пор, пока струи воды не станут бесцветными, осторожно высушивают фильтровальной бумагой. Если мазок правильно окрашен и промыт, то поле зрения абсолютно прозрачно, а клетки микробов интенсивно окрашены.

2. Методика и механизм окраски по методу Грама

<u>Метод Грама (модификация Синева)</u>

1. На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную генциановым фиолетовым на 2-3 мин.
2. Краску сливают, удаляют фильтровальную бумагу пинцетом и, не смывая водой, наливают раствор Люголя (I в KI)

3. Сливают раствор Люголя и, не смывая водой, препарат помещают в стаканчик с этанолом 2-3 раза, после чего быстро смывают водой.
4. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином 2 мин.
5. Краску смывают, промывают водой до тех пор, пока струи воды не станут бесцветными.
6. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и исследуют с иммерсионной системой.
Результаты: грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в красный (розовый).

Механизм окраски по Граму

1 этап. Используется основная краска генциановый фиолетовый, затем раствор Люголя. Образуется прочное комплексное соединение «генциановый фиолетовый+йод». Все микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

2 этап. Обработка этанолом (дифференциация)

одни микробы	*другие микробы*
сохраняют комплекс генциановый фиолетовый+йод, не обесцвечиваются это связано с тем, что:	теряют комплекс генциановый фиолетовый+йод, обесцвечиваются Это объясняется тем, что:
-клеточная стенка толстая,	-клеточная стенка микробов тонкая,
-в ее состав входит много пептидогликана,	-пептидогликана мало,
-имеются тейхоевые кислоты	- тейхоевых кислот нет
- по строению клеточная стенка представляет собой прочное образование, поэтому после обработки этанолом поры клеточной стенки суживаются и краска не вымывается.	- структура клеточной стенки мозаичная, рыхлая, поэтому после обработки этанолом поры остаются прежними, краска вымывается, микробы обесцвечиваются

3 этап. Окраска фуксином

одни микробы	*другие микробы*
остаются сине-фиолетовыми, **грамположительные:**	окрашиваются в красный цвет, **грамотрицательные:**
1.Все кокки за исключением гонококков и менингококков	1.Гонококки и менингококки
2.Все спорообразующие палочки	2.Большинство неспорообразующих палочек
3.Из неспорообразующих бактерий туберкулезная и дифтерийная палочки	3.Спириллы
4.Актиномицеты	4.Риккетсии
	5.Микоплазмы

Окраска по методу Грама не используется при изучении спирохет, простейших, грибов и вирусов.

3. Методы выявления капсул, спор, жгутиков

Выявление капсул

Принцип выявления капсул основан на том, что слизистый слой капсулы с высоким содержанием воды не связывает краситель, поэтому используют методики, контрастирующие окружающую среду, фон.

Методика Бурри-Гинса

1. Мазок, приготовленный из капсулообразующих бактерий, фиксируют в пламени спиртовки.
2. Окрашивают фуксином Циля через фильтровальную бумагу- 5 мин.
3. Мазок промывают водой, высушивают.
4. На высушенный мазок наносят каплю колларгола. С помощью предметного стекла колларгол распределяют тонким слоем, высушивают на воздухе, проводят микроскопию.

Микроскопическая картина: на коричневом (желтом) фоне видны ярко-красные тела бактерий, окруженные бесцветной каймой - капсулой).

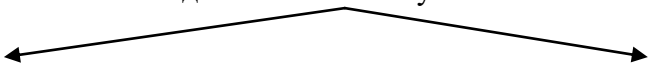
Выявление спор

При окрашивании спор используют такие методические приемы как:

1. нагревание пламенем спиртовки
2. обработка 5% раствором H_2SO_4
3. Использование концентрированного красителя - карболовый фуксин Циля (см. *методику Циля-Нильсена*)

Выявление жгутиков

Методы выявления жгутиков



прямые
- окраска по Леффлеру
- электронная микроскопия
- посев в полужидкие среды уколом в столбик

косвенные (по обнаружению подвижности)
- методы "висячей" и "раздавленной"капли

Лабораторное занятие №3

Тема: **МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.**
ЭУКАРИОТЫ. ВИРУСЫ. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ.

Продолжительность занятия: 3 часа
Цель занятия: 1. Закрепить теоретические знания по морфологии и ультраструктуре эукариотов (патогенных грибов, простейших), вирусов; особенностям генетики бактерий, вирусов. Изучить основные задачи и области применения биотехнологии.
2. Научиться определять морфологические особенности грибов, простейших.

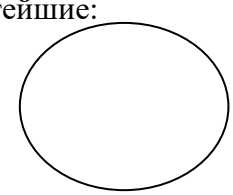
ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Особенности морфологии и медицинское значение грибов и простейших. Методы окраски.
2. Вирусы. Особенности морфологии и жизнедеятельности вирусов и бактериофагов. Микроскопические методы обнаружения вирусов.
3. Получение и применение бактериофагов. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов.
4. Строение генома бактерий.
5. Понятие о генотипе и фенотипе. Генотипическая и фенотипическая изменчивость у бактерий.
6. Особенности рекомбинативного процесса у бактерий.
7. Понятие, сущность, цели и задачи биотехнологии.
8. Генная инженерия, область применения в биотехнологии. Биопрепараты, полученные генно-инженерным методом.

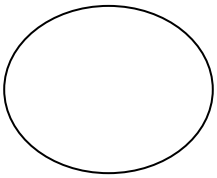
САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

Перечислить:
1. Виды мицелия грибов.
2. Структурные элементы простейших.
3. Основные структурные элементы вирусов.
4. Носители генетической информации у бактерий.
5. Зарисовать морфологию прокариотов, эукариотов и вирусов.

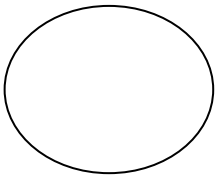
Простейшие:



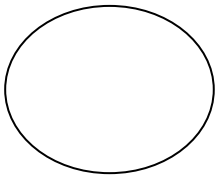
Споровики (токсоплазма)



Жгутиковые (трихомонады)

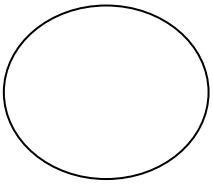


Саркодовые (амёбы)

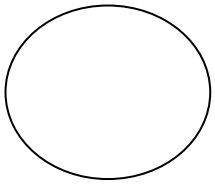


Ресничные (баланти-дий)

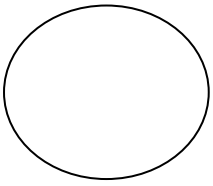
Грибы:



Плесневые

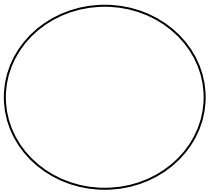


Дрожжевые

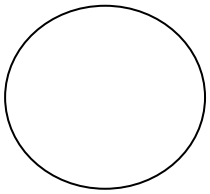


Дрожжеподобные

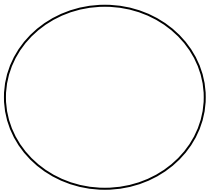
Вирусы:



Сферические
(ортомиксовирусы)



Палочковидные
(рабдовирусы)



Сложной формы
(бактериофаги)

2. Составить таблицы:
1. Микроорганизмы, клетки и процессы, применяемые в биотехнологии.
2. Препараты, полученные с помощью биотехнологии (см. образцы таблиц).

Таблица

Микроорганизмы, клетки и процессы, используемые в биотехнологии

№	продуценты и процессы	продукты
1	Дрожжи	хлеб, пиво, соки, кормовой белок, питательные среды и т.д.

Таблица

Препараты, полученные с помощью биотехнологии

№	препарат	применение
1		
2 и т.д.		

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова.- М.: Медицина, 1994. – 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина – 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. -72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить нативный мазок из чистой культуры дрожжей по типу «раздавленная капля». Промикроскопировать препарат, зарисовать.

Оснащение:

1) обезжиренные предметные стекла

2) бактериологическая петля
3) спиртовка, спички
4) восковой карандаш
5) пробирки с культурой дрожжей на жидкой питательной среде
6) покровное стекло
7) белые фильтровальные бумажки
8) иммерсионное масло
9) микроскоп.

Методика

Соблюдая правила асептики, приготовить мазок из чистой культуры дрожжей выращенной на жидкой питательной среде: с помощью бактериологической петли поместить каплю культуры на предметное стекло, накрыть покровным стеклом, излишки воды удалить фильтровальной бумагой. Промикроскопировать препарат, зарисовать.

2. Промикроскопировать готовые демонстрационные микропрепараты простейших (просмотреть слайды). Описать морфологию, зарисовать.

Оснащение:

1) слайды (готовые демонстрационные препараты представителей различных классов простейших - споровиков, саркодовых, жгутиковых, ресничных).
2) мультимедийный проектор, ноутбук.

Методика

Методику микроскопии в иммерсионной системе см. в разделе «Практическая работа», работа №3, лабораторного занятия №1.

3. Изучить и зарисовать включения вируса бешенства в нервной ткани (тельца Бабеша-Негри).

Оснащение:

1) Демонстрационный препарат включений вируса бешенства в нервной ткани (тельца Бабеша-Негри)
2) Таблица «Бешенство»
3) слайды «Тельца Бабеша-Негри»
4) мультимедийный проектор, ноутбук.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Морфологические особенности грибов и простейших.
2. Микроорганизмы, используемые в генной инженерии**.**
3. Стадии биотехнологического производства.

1. Морфологические особенности грибов и простейших

Грибы – это грамположительные неподвижные микроорганизмы растительного происхождения. Клетка гриба покрыта оболочкой, имеется ядро, цитоплазма, вакуоли, эндоплазматическая сеть и митохондрии.

Существует 2 типа роста грибов: мицелиальный и дрожжевой. Первый тип характерен для ***плесневых*** грибов (рис.1, а). Основа их тела или структурная единица– гифа- разветвленная микроскопическая трубка, содержащая цитоплазму и органеллы. Совокупность гиф образует мицелий. Мицелий может быть септированным (с перегородками) и несептированным. Выделяют мицелий вегетативный (для питания) и репродуктивный (для размножения, т.к. несет репродуктивные структуры – спорофоры.). ***Дрожжевой*** тип: представлен в виде одиночных клеток различной формы (овальных, круглых, палочковидных, рис. 1, б)**.**

Многие виды грибов проявляют **диморфизм,** т. е. способность существовать в той и другой форме. Например, у возбудителя гистоплазмоза мицелиальная форма образуется при росте на питательной среде, а в организме человека, животного формируется дрожжевая форма.
Существует также псевдомицелий - цепочки удлиненных клеток с расположенными на них дрожжеподобными бластоспорами. (у дрожжеподобных грибов, рис.1, в)

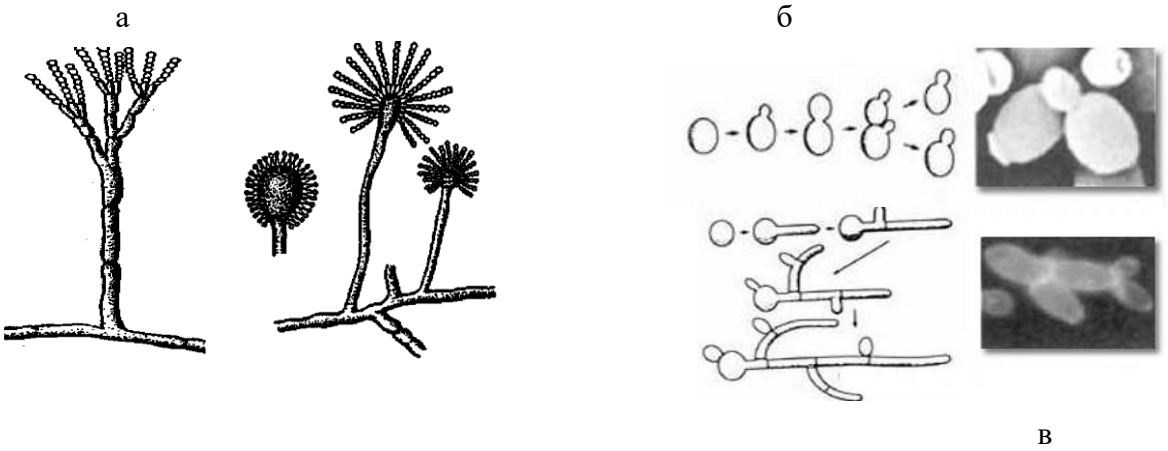


Рис.1. Виды грибов
а - плесневые грибы, б - дрожжевые грибы, в – дрожжеподобные грибы

Простейшие – одноклеточные эукариотические животные организмы, это самые крупные микроорганизмы, самые высокоорганизованные. Имеют дифференцированное ядро, цитоплазму, оболочку, примитивные органоиды. Многие из них образуют цисты, обеспечивающие длительную устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.
В зависимости от наличия тех или иных органов передвижения осуществляется классификация простейших (рис. 2): саркодовые передвигаются с помощью ложноножек, жгутиковые – с помощью одного или нескольких жгутиков, ресничные – с помощью ресничек, у споровиков органов передвижения нет.

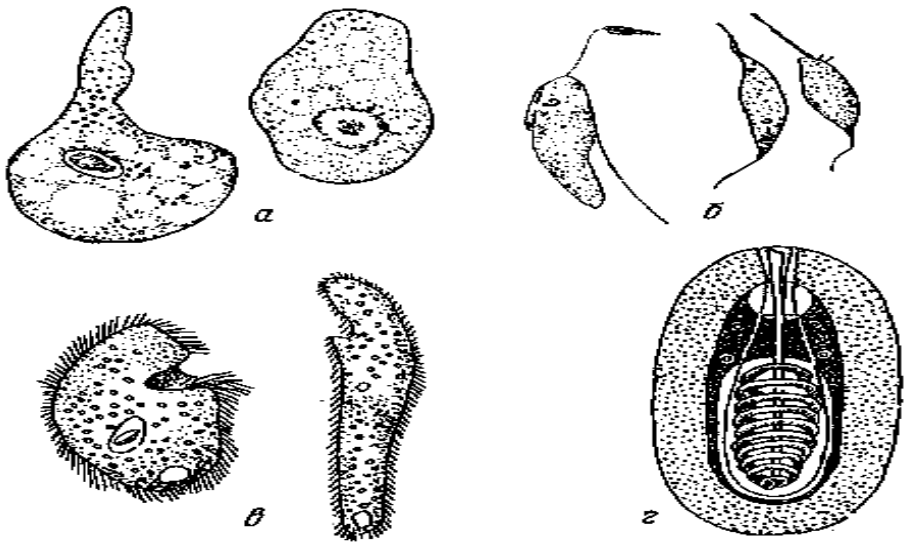


Рис. 2. Виды простейших: а – саркодовые,
б – жгутиковые, в – ресничные, г – споровики

2. Микроорганизмы, используемые в биотехнологии

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих реакции, полезные для человека, несколько сотен видов. В качестве биотехнологических объектов используют вирусы, бактерии, грибы, простейшие (рис. 3).

а б в

Рис. 3. Микроорганизмы, используемые в биотехнологических процессах: а – дрожжи, б – бактерии; в – простейшие

Бактерии используются при производстве: пищевых продуктов, например, уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков (*Lactobacillus, Leuconostoc*), сока; микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*); белка (*Methylomonas*, дрожжи); витаминов (Clostridium - рибофлавин); антибиотиков (*Cephalosporum acremonium, Bacillus brevis, Bacillus subtilis),* вакцин и др.

Биотехнологические функции грибов разнообразны. Их используют для получения таких продуктов, как антибиотики (пенициллы, цефалоспорины); белок (*Candida, Saccharomyces lipolitica*); сыры типа рокфор и камамбер (пенициллы); соевый соус (*Aspergillus oryzae*) и др.

К грибам относятся дрожжи и плесени. Преимущество дрожжей заключается прежде всего в их "технологичности": дрожжи легко выращивать в условиях производства. Они характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами. Наиболее ценный компонент дрожжевой биомассы - белок, который по составу аминокислот превосходит белок злаковых культур и лишь немного уступает белкам молока и рыбной муки. Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма.

Плесневые грибы привлекают внимание исследователей благодаря способности утилизировать самое разнообразное по составу органическое сырье: молочную сыворотку, сок растений и корнеплодов, целлюлозосодержащие твердые отходы пищевой, деревообрабатывающей, гидролизной промышленности. Грибной мицелий богат белковыми веществами, которые по содержанию незаменимых аминокислот ближе всего к белкам сои.

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. До недавнего времени они использовались лишь как компонент активного ила при биологической

очистке сточных вод. В настоящее время они привлекли внимание исследователей как продуценты некоторых биологически активных веществ, например, обладающих противоопухолевой активностью. Простейшие используются в производстве кормового белка, являются источниками полисахаридов.

Производственные штаммы микроорганизмов должны соответствовать определенным требованиям: способность к росту на дешевых питательных средах, высокая скорость роста и образования целевого продукта, минимальное образование побочных продуктов, стабильность продуцента в отношении производственных свойств, безвредность продуцента и целевого продукта для человека и окружающей среды.

Стадии биотехнологического производства

В общем виде система биотехнологического производства продуктов микробного синтеза представлена на рисунке 4.

Существует 5 стадий биотехнологического производства.

Две начальные стадии включают подготовку сырья и биологически действующего начала. Они обычно состоят из приготовления раствора субстрата (питательной среды) с заданными свойствами (pH, температура, концентрация) и подготовки ферментного препарата (первая стадия). Вторая стадия – культивирование штамма-продуцента. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - главная задача любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами.

Третья стадия - ферментации, на которой происходит образование целевого продукта. На этой стадии идет микробиологическое превращение компонентов питательной среды сначала в биомассу, затем, если это необходимо, в целевой метаболит.

На четвертом этапе из культуральной жидкости выделяют и очищают целевые продукты. Для промышленных микробиологических процессов характерно, как правило, образование очень разбавленных растворов и суспензий, содержащих, помимо целевого, большое количество других веществ. При этом приходится разделять смеси веществ близкой природы, находящихся в растворе.

Заключительная стадия биотехнологического производства - приготовление товарных форм продуктов. Особые требования предъявляются к медицинским препаратам и биохимическим реактивам.

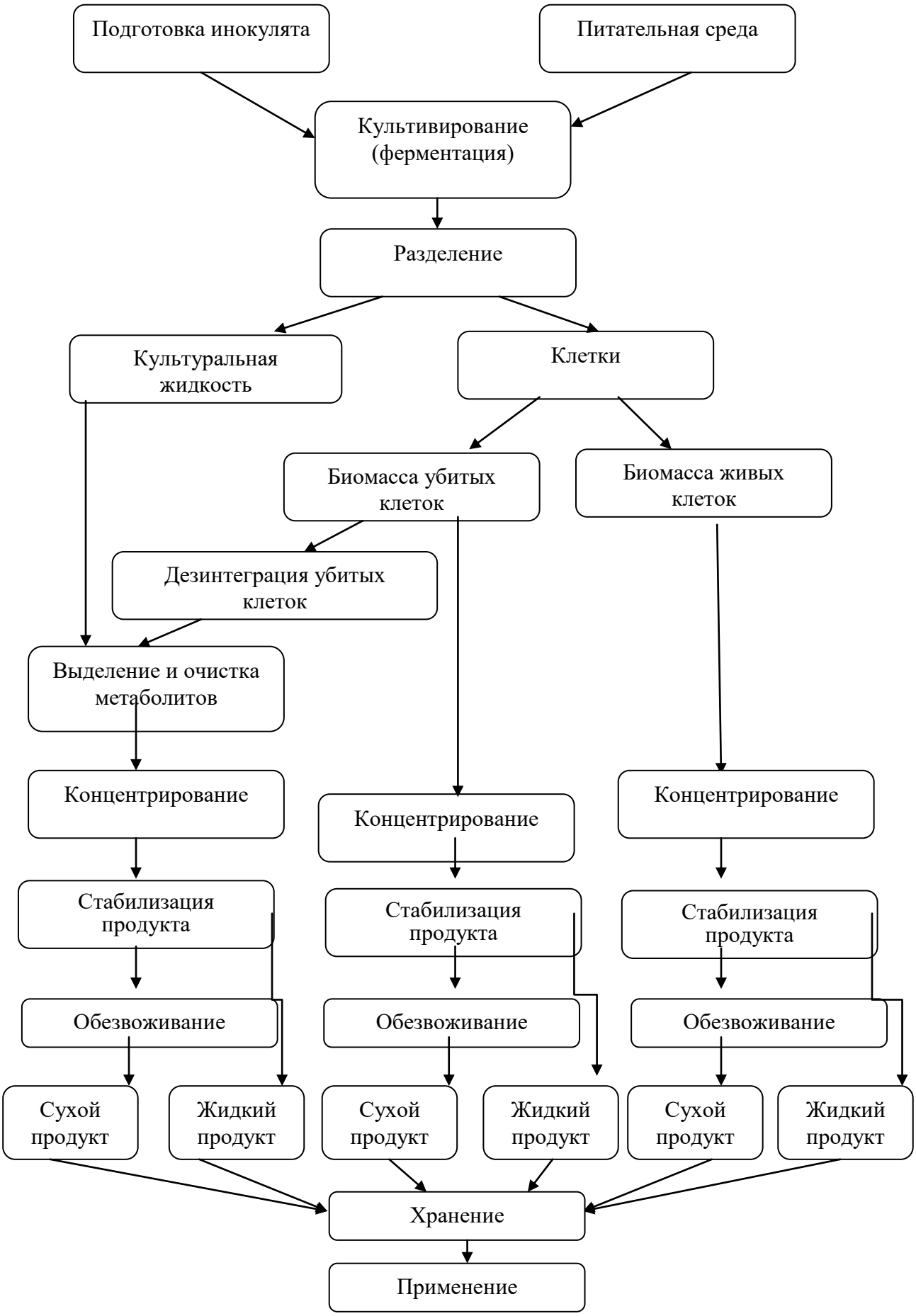


Рис. 4. Система биотехнологического производства

Лабораторное занятие №4
Тема: **ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Продолжительность занятия: 3 часа

***Цель занятия*:** изучить основные физиологические процессы, протекающие в микробных клетках; принципы культивирования микроорганизмов. Освоить методы посева и пересева микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Химический состав микробной клетки.
2. Ферменты и пигменты микробов. Их биологическая роль.
3. Питание микробов. Типы питания. Питательные среды. Виды, получение, назначение.
4. Дыхание микроорганизмов, типы дыхания.
5. Рост и размножение микробов
6 Принцип и методы культивирования вирусов и риккетсий, анаэробов.
7. Понятие о чистой культуре и колонии микроорганизмов, методы выявления чистых культур.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Выписать классификацию бактерий по типам дыхания с примерами.
2. Выписать классификацию бактерий по типам питания.
3. Выписать классификацию питательных сред:

а) по консистенции (с примерами, указать концентрацию агар-агара)
б) по целевому назначению (дать определение, привести примеры)

4. Выписать культуральные признаки колоний:
5. Изучить таблицы:
    1. Роль микробов в природе и жизни.
    2. Использование микробных ферментов в промышленности.
6. Решить ситуационные задачи.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
4. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. - С. 352 с.
5. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

Таблица 1

Роль микробов в природе и жизни

№	Использование, участие	Роль
1	В круговороте веществ и энергии в природе.	-обусловливают разложение органических веществ и возможность существования жизни на Земле -обусловливают запасы и разведку угля, нефти, торфа, известняка, железа, сероводорода и др.
2	В сельском хозяйстве	Используют: -для повышение плодородия почвы -в качестве удобрения- нитраты - в качестве кормового белка (БВК) -при силосовании клевера, люцерны -при обработке соломы, хлопковых коробочек и др. и для перевода их в легко усвояемые корма -для получения ферментов, аминокислот, антибиотиков
3	В пищевой и винодельческой промышленности	Используют в производстве пива и спирта; соков, варений, сиропов; сыра; кисломолочных продуктов; квашеных продуктов
4	В рыбной и мясной промышленности	Используют для размягчения мяса, рыбы
5	В космической промышленности	Используют: -как индикаторы влияния космических условий -для изучение влияния на генотип
6	В фармацевтической промышленности	Используют для производства: -вакцин -иммунных сывороток -антибиотиков -ферментов -витаминов -гормонов -интерферонов

Таблица 2

Использование микробных ферментов в промышленности

№	Фермент	Вид промышленности	Применение
1	Амилаза	химическая	-производство спирта, ацетона и т.д.
		пищевая	-пивоварение -хлебопечение -получение: • крупяных изделий для детского питания • фруктовых соков, экстрактов, варений, сиропов • сыра
		легкая	-расшлихтовка растительного волокна перед отбеливанием и окрашиванием
		бумажная	-при проклейке бумаги, для придания бумаге упругости, плотности, глянца
		бытовая	-приготовление растворимого крахмала --моющих средств (БИО)
2	Протеиназа	мясная и рыбная	-для размягчения мяса, рыбы -для ускорения засолки сельди, балыка -гидролиз несортного рыбного мяса

		молочная	-сыроделие -кисломолочных продукты -сырковая масса

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Ознакомиться с различными питательными средами, применяемыми для культивирования микроорганизмов.

Оснащение:

1) полуфабрикаты простых и специальных питательных сред во флаконах;
2) пробирки с МПБ и МПА (столбиком и скошенный);
3) чашки с МПА, с кровяным агаром, с дифференциально-диагностической средой Эндо;
4) среды "пестрого ряда".

2. Изучить характер роста разных видов микроорганизмов на питательных средах. Описать морфологию колоний (см. таблицу). Зарисовать.

Оснащение:

1) Культуры кишечной палочки, стафилококка белого, сарцины в пробирках (чашках) с МПА.
2) Культура дрожжевых грибов на среде Сабуро (слайд).
3) Культура золотистого стафилококка на желточно-солевом агаре (слайд).
4) Среды Гисса с культурой кишечной палочки.
5) Таблица и слайды «Рост микробов при посеве уколом в столбик сахарного агара и на МПБ»
6) Мультимедийный проектор, ноутбук.

Таблица

Морфология колоний

№	Макроскопические исследования						Микроскопические исследования	
	размер	форма	прозрачность	цвет	поверхность	консистенция	край	структура

3. Осуществить посев чистой культуры микроорганизмов:

а) с плотной питательной среды (скошенный агар) на жидкую питательную среду;
б) с жидкой питательной среды на плотную питательную среду:
- методом истощающего штриха на агар в чашку Петри (используя метод Дригальского),
- методом штриха на скошенный агар
- методом газона

Оснащение:

1. спиртовка, спички
2. бактериологическая петля
3. пробирка со стерильным МПБ
4. пробирка со стерильным МПА
5. 2 чашки Петри со стерильным МПА
6. пробирка с культурой кишечной палочки на МПБ
7. пробирка с культурой стафилококка на МПА
8. таблица "Техника посева бактериальных культур"

Методика

Посев с плотной питательной среды на жидкую

Пробирку с культурой на плотной питательной среде и пробирку со стерильной жидкой питательной средой одновременно поместить в левую руку в наклонном положении между большим и указательным пальцами так, чтобы можно было наблюдать поверхность среды. Петлю, находящуюся в правой руке, прокаливают. Правой рукой вынимают из пробирок ватные пробки над пламенем горелки, охлаждают петлю о стенку пробирки, набирают петлей посевной материал, после чего закрывают пробирку с культурой пробкой, пронося горлышко пробирки через пламя спиртовки. В пробирку с МПБ вносят петлю с посевным материалом, погружают в среду. Вынув петлю, обжигают край пробирки и закрывают ее пробкой. Петлю стерилизуют в пламени горелки и ставят в штатив.

Посев с жидкой питательной среды на плотную методом истощающего штриха (метод Дригальского)

Чашку Петри с плотной питательной средой делят на 4 -5 радиальных секторов. Пробирку с бактериальной культурой в жидкой питательной среде помещают в левую руку. Петлю, находящуюся в правой руке, прокаливают. Правой рукой, одновременно держа в ней петлю, вынимают из пробирки ватную пробку, пронося край пробирки над пламенем спиртовки, набирают петлей посевной материал, после чего закрывают пробирку пробкой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку - "зеркало". Затем левой рукой приоткрывают один край чашки, вносят внутрь петлю и засевают материал на сектор среды, нанося параллельны штрихи с интервалом 4 - 5 мм. Не обжигая петли и не забирая дополнительно посевного материала, аналогичным образом засевают культуру штрихом на оставшиеся сектора – метод получения изолированных колоний, содержащих чистую культуру по Дригальскому. Вынув петлю, стерилизуют ее в пламени горелки и ставят в штатив.

Посев на скошенный агар

Петлю с находящимся на ней материалом вводят в пробирку до нижнего края среды и скользящим движением делают штрихи на поверхности среды от стенки к стенке снизу вверх.

Посев с жидкой питательной среды на плотную методом газона

Посевы газоном производят шпателем на агар в чашке Петри. Для этого, приоткрыв крышку, петлей наносят посевной материал на поверхность агара. Затем проводят шпатель через пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и распределяют материал по всей поверхности среды. При этом крышку придерживают левой рукой и одновременно вращают чашку, не отрывая ее от стола. После инкубации посева появляется равномерно сплошной рост.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Общие требования к осуществлению посевов.
2. Техника посева и пересева.
3. Культуральные свойства колоний.

1. Общие требования к осуществлению посевов

Все манипуляции, связанные с взятием и посевом материала, производят над пламенем горелки. Края пробирки при вынимании пробки прожигают. Бактериальную петлю прокаливают на огне непосредственно перед взятием материала. Пробирки закрывают, предварительно обжигая их края и ту часть пробки, которая входит в

горлышко пробирки. По окончании работы петлю стерилизуют в пламени горелки и ставят в штатив.

2. Техника посева и пересева

Посев с плотной питательной среды на жидкую питательную среду.

Пробирку с культурой на плотной питательной среде и пробирку со стерильной жидкой питательной средой одновременно поместить в левую руку в наклонном положении между большим и указательным пальцами так, чтобы поверхность среды можно было наблюдать. Петлю, находящуюся в правой руке, прокаливают. Правой рукой вынимают из пробирок ватные пробки над пламенем горелки, охлаждают петлю о стенку пробирки, набирают петлей посевной материал, после чего закрывают пробирку с культурой пробкой, пронося горлышко пробирки через пламя спиртовки. В пробирку с МПБ вносят петлю с посевным материалом, погружают в среду. Вынув петлю, обжигают край пробирки и закрывают ее пробкой. Петлю стерилизуют в пламени горелки и ставят в штатив.

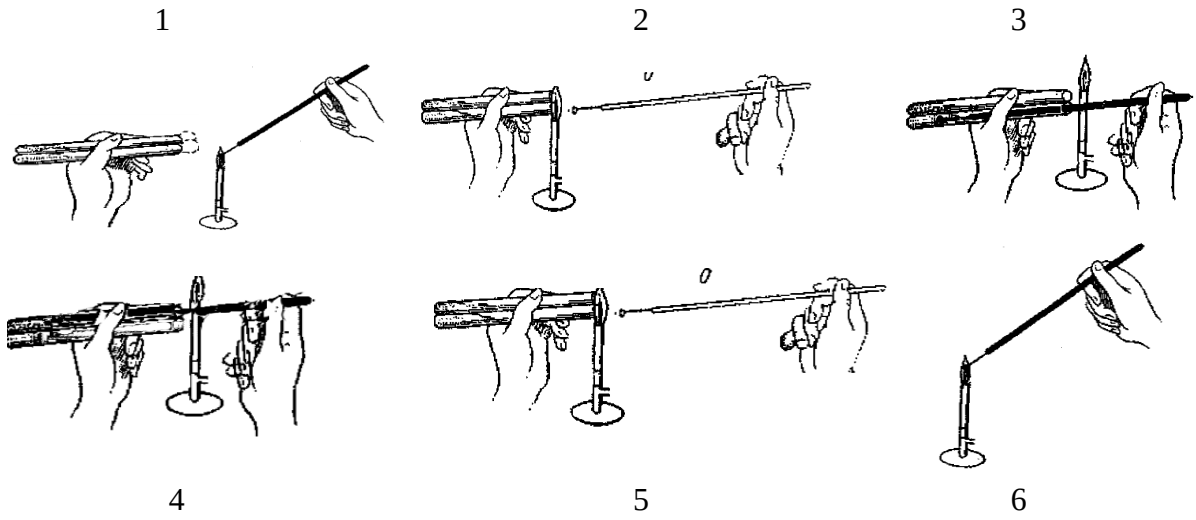
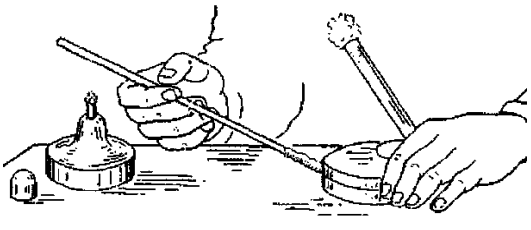
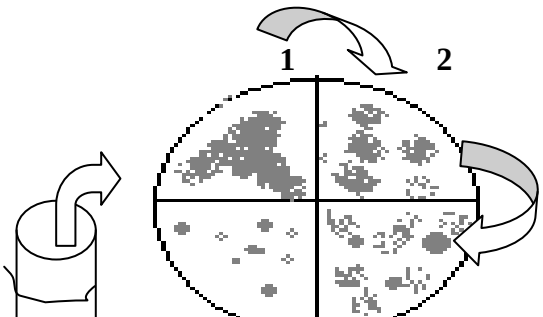


Рис. 1 Техника посева с плотной питательной среды на жидкую питательную среду.

Посев с жидкой питательной среды на плотную питательную среду методом штриха (используя метод Дригальского)

Чашку Петри с плотной питательной средой делят на 4 -5 радиальных секторов. Пробирку с бактериальной культурой в жидкой питательной среде
помещают в левую руку. Петлю, находящуюся в правой руке, прокаливают. Правой рукой, одновременно держа в ней петлю, вынимают из пробирки ватную пробку, пронося край пробирки над пламенем спиртовки, набирают петлей посевной материал, после чего закрывают пробирку пробкой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку - "зеркало". Затем левой рукой приоткрывают один край чашки, вносят внутрь петлю и засевают материал на сектор среды, нанося параллельны штрихи с интервалом 4 - 5 мм. Не обжигая петли и не забирая дополнительно посевного материала, аналогичным образом засевают культуру штрихом на оставшиеся сектора – метод получения изолированных колоний, содержащих чистую культуру по Дригальскому. Вынув петлю, стерилизуют ее в пламени горелки и ставят в штатив.





4 3

4 сектор - изолированные колонии

Рис. 2 Техника посева на плотную питательную среду методом Дригальского.

Колония – видимое невооруженным взглядом скопление микробов на плотной питательной среде, выросшее из одной клетки. Колония - это потомство микробов, выросших из одной клетки. Т.к. все микробы в колонии выросли из одной клетки, они относятся к одному виду, т.е. в каждой изолированной колонии (отдельно стоящей, не сливающейся с другими колониями) содержится ***чистая культура.***

При посеве на скошенный агар петлю с находящимся на ней материалом вводят в пробирку до дна и скользящим движением делают штрихи на поверхности среды от стенки к стенке снизу вверх.

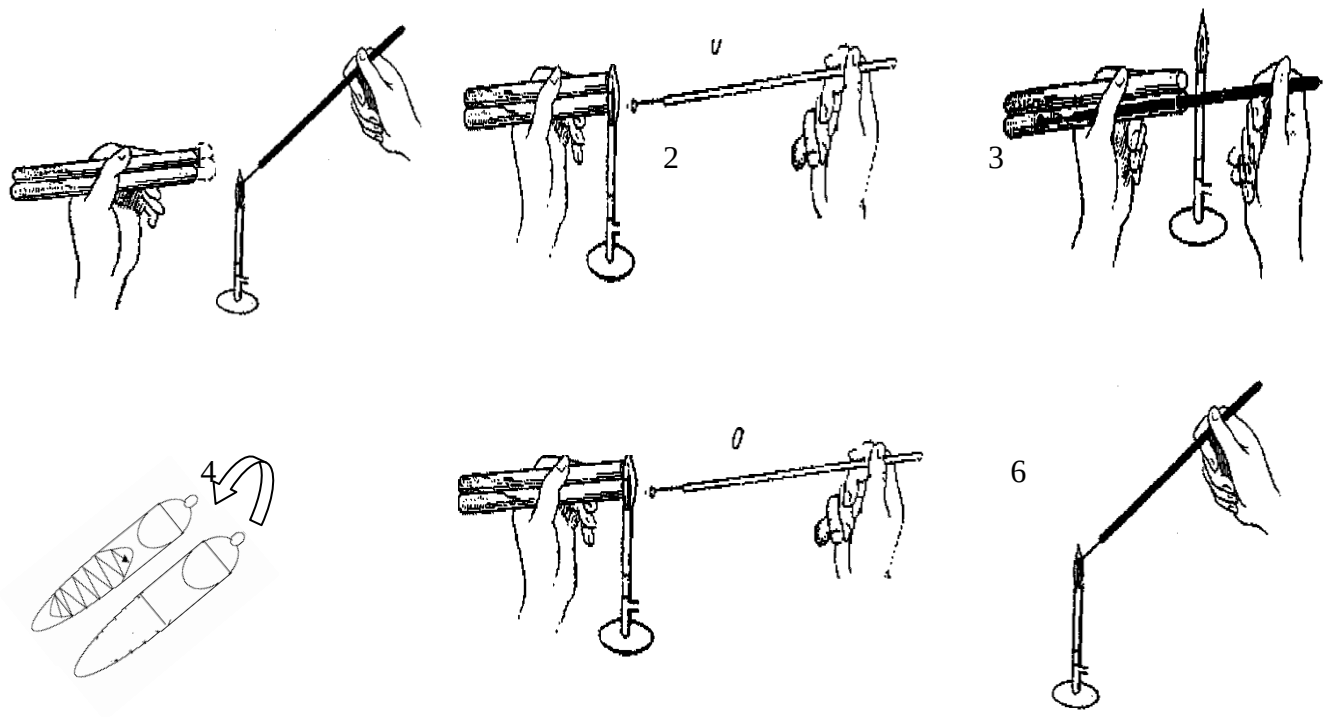


Рис. 3 Техника посева с жидкой питательной среды на скошенный агар

Посев с жидкой питательной среды на плотную питательную среду методом газона.
Посевы газоном производят шпателем на агар в чашке Петри. Для этого, приоткрыв крышку, петлей наносят посевной материал на поверхность агара. Затем проводят шпатель через пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и распределяют материал по всей поверхности среды.

При этом крышку придерживают левой рукой и одновременно вращают чашку, не отрывая ее от стола. После инкубации посева появляется равномерно сплошной рост.

Рис. 4. Посев с жидкой питательной среды на плотную питательную среду методом газона

.

3. Культуральные свойства колоний

1. *Форма колоний* может быть круглой, неправильной, корневидной, эллипсовидной и т.д.

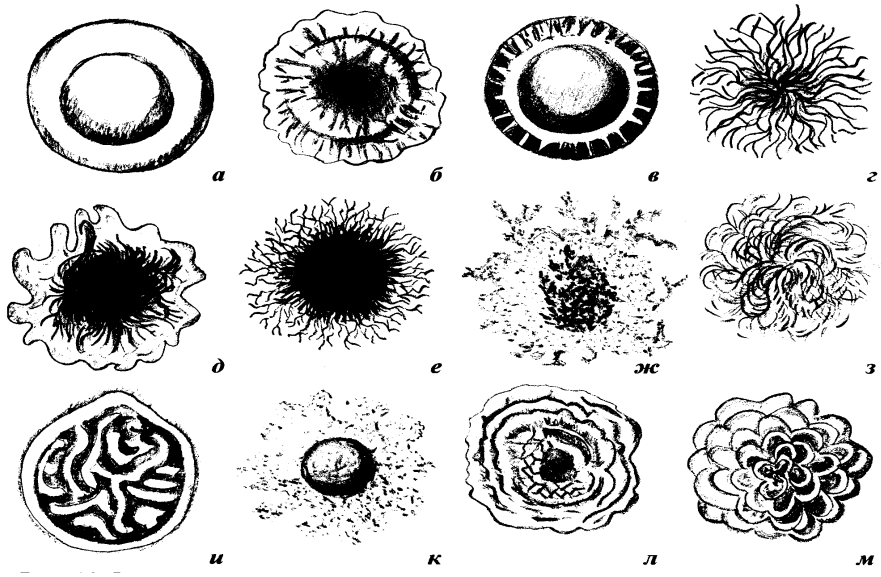


Рис. 5. Форма колоний: а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж –амебовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

2. Размеры колоний: Колонии, имеющие диаметр более 4 мм являются крупными, от 2 до 4 мм – средними, от 1 до 2 мм – мелкими, менее 1 мм - точечными или росинчатыми.

3.Цвет колоний: Микроорганизмы, содержащие пигменты могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и др. цветов. Большинство микроорганизмов не содержат пигментов и растут на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии называют бесцветными.

4. Поверхность колоний: Поверхность колоний может быть гладкой, блестящей, шероховатой, морщинистой, извилистой и т.д.

5. Характер края колоний: Край может быть ровным (гладким); волнистым; локонообразным (нитчатым); лопастным; бахромчатым; зазубренным; корневидным (ветвистым) и др.

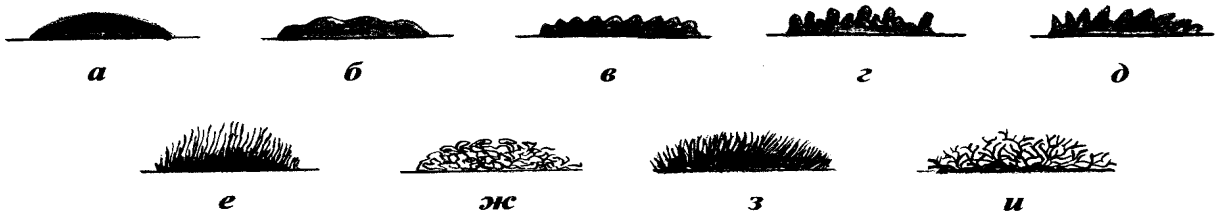


Рис. 6 Край колоний: *а - гладкий; б – волнистый; в – зубчатый; г – лопастный; д – неправильный; е – реснитчатый;ж – нитчатый; з – ворсинчатый; и - ветвистый*

6. Прозрачность колоний: Колонии бывают прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные.
7. Структура колоний: Структура колоний бывает однородная (гомогенная) и неоднородная (гетерогенная). Неоднородные колонии могут быть мелко- и крупнозернистыми, радиально или концентрически исчерченными, чешуйчатыми и др.
8. Консистенцию колоний: Определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа.

Лабораторное занятие №5

Тема: ВЛИЯНИЕ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ФИЗИЧЕСКИХ, ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Продолжительность занятия: 3 часа
Цель занятия: Изучить физические, химические и биологические факторы, оказывающие воздействие на микробов, применение этих факторов в фармации и медицине. Освоить методы асептики, антисептики, стерилизации, дезинфекции.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Взаимоотношения микробов и окружающей их среды обитания.
2. Влияние биологических факторов на микроорганизмы.
3. Влияние физических факторов: температуры, высушивания, лучистой энергии. Использование физических факторов в медицине и фармации.
4. Влияние химических факторов. Характеристика дезинфицирующих средств.
5. Асептика, понятие, методы.
6. Антисептика, понятие, методы.
7. Стерилизация, виды, режим. Методы контроля стерильности.
8. Дезинфекция понятие. Виды и методы.
9. Дезинсекция понятие. Виды и методы.
10. Дератизация, виды и методы.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

Выписать в тетрадь:
1) методы контроля режима стерилизации;
2) методы контроля стерильности питательных сред;
3) дробные методы стерилизации.

Изучить таблицу «Виды, методы и режимы стерилизации» (таблица 1).

ЛИТЕРАТУРА:
1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. - М.: Медицина, 1994. – 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

Таблица 1

Виды, методы и режимы стерилизации

Вид обработки	Метод	Стерилизующий агент	Режим			Аппараты	Стерилизуемые объекты
			давление, атм.	температура, °С	время		
I. Физические: а) термическая	фламбирование	огонь	-	700	5-7 с	спиртовка, горелка	-бак. петли -иглы -ножницы скальпели -шпатели
	Паровой:	водяной пар	-			паровой стерилизатор	-лек. препараты, разрушающиеся при t более 100°
	а) текучим паром	водяной пар	-	100	30-60 мин, 3 дня	паровой стерилизатор, крышка закрыта неплотно	-питательные среды с углеводами
	б) паром под давлением	водяной пар	1 атм. 2 атм.	120 132	45 мин 20 мин	паровой стерилизатор, крышка закрыта герметично	все, что не разрушается при t более 100°: простые питательные среды, -лек. препараты, -перевязочный материал, халаты, посуда, инструменты

	воздушный	горячий воздух	-	160 170 180	2,5 ч 2 ч 1 ч	воздушный стерилизатор	-стеклянные изделия -изделия из металла -пробки силиконовая резина
	тиндализация	горячая вода	-	56-58	по 1 ч 5-6 дней подряд	водяная баня	лек. вещества, содержащие белок
	током высокой частоты	высокая температура	-	-	-	выпрямитель переменного тока, ламповый высокочастотный	-консервы
б)ультрафиолетовыми лучами		лучи с длиной волны 253-257 нм	-	-	-	ртутно-кварцевые и органортутные лампы	-воздух -вода
в) радиационная		лучи ионизирующего излучения Co^{60}, Co^{137}	-	-	-	гамма-установки ускорителей электронов	-изделия из пластмассы, -изделия одноразового использования в упаковке, -перевязочные материалы, -некоторые лек. препараты (морфин, кодеин и др.)
г) механические		фильтрующие пластины	-	-	в зависимости от объема	бактериальные фильтры-свечи	-антибиотики, -иммунные сыворотки, бактериофаги, иммуноглобулины, -экзотоксины
д) мембранная фильтрация		фильтры	-	-	-	мембрано-фильтрующие установки	-лек. препараты
II. Химические	химический	Газы (окись этилена, окись пропилена), H_2O_2	-	55-65 18 50	5-6 ч 6 ч 3 ч	закрытые емкости	-хирургические инструменты с зеркальной поверхностью, -оптическое оборудование, - радиоэлектрон-

							ное оборудование, -изделия из стекла, -полимеры, -корроз. стойкие металлы

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Изучить влияние действия высокой температуры на спорообразующие и неспорообразующие бактерии.

Оснащение:

1) 6 пробирок с жидкой питательной средой (мясопептонный бульон - МПБ): 4 опытных, 2 контрольных
2) пробирки с культурой *B. anthracoides* и *E. coli*
3) водяная баня
4) пинцет
5) спиртовка, спички

Методика

В 3 пробирки с питательной средой (мясопептонный бульон) поместить по 0,1 мл культуры *E. coli* (неспорообразующие микроорганизмы). В 3 пробирки с питательной средой (мясопептонный бульон) поместить по 0,1 мл культуры *B. anthracoides* (спорообразующие микроорганизмы)

По одной пробирке с каждой культурой поместить на водяную баню в течение 5 мин. По одной пробирке с каждой культурой поместить на водяную баню в течение 30 мин. (воздействие высокой температуры). Оставшиеся пробирки – контроли – воздействию не подвергаются.

После обработки все посевы (пробирки) помещают в термостат на 24 часа при t=37°C. Учет результатов производят по наличию или отсутствию признаков роста на жидкой питательной среде (помутнение, пленка, осадок).

2. Изучить влияние УФ-лучей на спорообразующие и неспорообразующие бактерии

Оснащение:

1) пробирки с культурой B. anthracoides и E. coli
2) 2 чашки Петри с твердой питательной средой (мясопептонный агар - МПА)
3) бактериологическая петля
4) шпатель
5) спиртовка, спички
6) маркер
7) трафарет из светонепроницаемой бумаги с отверстием в центре
8) кварцевая лампа

Методика

Культуры засевают шпателем (газоном) на мясопептонный агар (МПА) на 1-й и 2-й сектора, закрывают трафаретом и при открытой чашке подвергают облучению ультрафиолетовыми лучами в течение 10 мин.

Чашки подписывают по крышке: № группы, название культуры. Посевы помещают в термостат при t 37ºС на 24 часа. Учет производят по наличию или отсутствию роста

микробов в области, подвергшейся УФ-облучению, сравнивают чувствительность культур к действию ультрафиолетовых лучей. Схему зарисовать в рабочую тетрадь.

3. Изучить влияние дезинфицирующих растворов на спорообразующие и неспорообразующие бактерии методом бумажных дисков (качественный тест).

Оснащение:

1) пробирки с культурой *B. anthracoides* и *E. coli* на МПБ
2) 2 чашки Петри с плотной питательной средой (мясопептонный агар - МПА)
3) бактериологическая петля
4) шпатель
5) растворы дезинфицирующих веществ (1% раствор хлорамина Б, 5% раствор фенола, 1% раствор лизафина)
6) диски из фильтровальной бумаги
7) спиртовка, спички
8) маркер
9) стерильная пипетка 1,0 мл

Методика

Исследуемые культуры (*B. anthracoides* и *E. coli*) засевают шпателем (газоном) на чашки Петри (МПА).

- 1-я чашка на спорообразующую культуру (*B. anthracoides*);
- 2-я чашка на неспорообразующую культуру (*E. coli*).

Диски из фильтровальной бумаги смочить растворами 3 исследуемых дезинфицирующих веществ (1% раствор хлорамина В, 5% раствор фенола, 1% раствор лизафина) и поместить на засеянную поверхность.

Посевы помещают в термостат при t 37ºС на 24 часа. Учет производят по диаметру зоны задержки роста микробов вокруг дисков.

На основании полученных результатов необходимо - сделать вывод о чувствительности спорообразующих и неспорообразующих бактерий к действию изученных растворов дезинфицирующих средств.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Влияние на микроорганизмы биологических, физических, химических факторов.
2. Методы борьбы с микроорганизмами

1. Влияние на микроорганизмы биологических, физических, химических факторов.

Биологические факторы

Симбиоз – благоприятное сосуществование представителей разных биологических видов, без нанесения вреда одному из видов.

Мутуализм – взаимовыгодные отношения между организмами. Обычно, один из партнёров использует продукты жизнедеятельности другого в качестве пищи, тогда как второй получает благоприятные для роста и размножения условия.

Комменсализм – способ совместного существования двух разных видов живых организмов, при которых одна популяция извлекает пользу от взаимоотношения, а другая не получает ни пользы ни вреда.

Антагонизм – неблагоприятное сосуществование представителей разных биологических видов, один из видов наносит вред жизнедеятельности другого.

Паразитизм – вид неблагоприятного сосуществования, когда один вид (паразит) использует другой вид (хозяин) как источник питания, среду обитания. Примером является система – «человек – патогенный микроорганизм».

Хищничество – вид неблагоприятного сосуществования, когда один вид (хищник) использует другой вид (сегмент пищевой цепочки) в качестве пищи, что приводит к гибели последнего.

Физические факторы. Механизмы неблагоприятного воздействия физических факторов на микроорганизмы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Механизмы неблагоприятного воздействия физических факторов на микроорганизмы

Вид фактора	Механизм неблагоприятного действия
Температура	Высокая (более 60°С) температура вызывает коагуляцию белка.
Высушивание	Обезвоживание микроорганизма и нарушение основных оксилительно-восстановительных процессов
Лучистая энергия	На уровне клетки – стимуляция образования свободных радикалов; На уровне нуклеиновых кислот – образование нежизнеспособных димеров нуклеиновых кислот
Ультразвук	Образование кавитационных полостей в цитоплазме клетки
Осмотическое давление	Изменение поверхностного натяжения клетки
Фильтрование	Механическое разделение неоднородных сред

Химические факторы. Механизмы неблагоприятного воздействия различных групп химических соединений на микроорганизмы представлены в таблице 2

Таблица 2

Механизмы неблагоприятного воздействия химических факторов на микроорганизмы

Вид фактора	Механизм неблагоприятного действия
Спирты	Денатурация (свертывание) белка.
Галогениды	Обусловлено выделением атомарного (свободного) галоген-радикала, который денатурирует протоплазму клеток путем взаимодействия с аминогруппами белков.
ПАВ Препараты ЧАС	Нарушают поверхностное натяжение клетки.
Окислители	Окисление компонентов клеточной стенки.
Альдегиды	Обусловлено разрушением клеточных мембран, денатурацией белков и инактивацией ферментов
Тяжелые металлы	Обусловлено инактивацией жизненно важных ферментов микробной клетки. Инактивация ферментов происходит путем взаимодействия ионов тяжелых металлов (Me^{2+}) с сульфгидрильными группами ферментов.

2. Методы борьбы с микроорганизмами

Асептика – комплекс профилактических мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов в лекарственный препарат, питательную среду, рану и т.д.

В комплекс мероприятий асептики входят:

1. Создание санитарно-гигиенического режима (приказ №309 от 20.10.97 "Об утверждении по санитарному режиму аптек"),

2. Требования к персоналу, к помещению.
3. Стерилизация инструментов, посуды, вспомогательного материала и т.д.

Антисептика – комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на *уничтожение* уже попавших микробов в объект (лекарственный препарат, питательную среду, рану и т.д.).

Дезинфекция – комплекс лечебно-профилактических мероприятий, направленных на *предотвращение* попадания микроорганизмов на объект.

Стерилизация - это комплекс мероприятий, направленных на *полное* освобождение объекта от всех микробов: патогенных и непатогенных, споровых и неспоровых.

Стерилизация - процесс умерщвления в объекте или удаления из него всех микробов находящихся на всех стадиях развития (ГФ-11,1990 т-2)

Дезинсекция – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение насекомых, являющихся переносчиками инфекционных заболеваний (клещи, вши, мухи и т.д.)

Дератизация – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение грызунов, являющихся источниками инфекционных заболеваний (зоонозов)

Лабораторное занятие №6

Тема: ПРОТИВОМИКРОБНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: изучить явления антагонизма микроорганизмов, классификацию, основные группы химиопрепаратов и антибиотиков, механизм их действия, освоить методику учета результатов определения влияния физических и химических факторов на спорообразующие и неспорообразующие микроорганизмы; освоить методы определения чувствительности микробов к антибиотикам.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ.

1) Химиотерапия. Требования к химиотерапевтическим препаратам.
2) Микробный антагонизм. История открытия антибиотиков. Роль отечественных ученых.
3) Принципы классификации антибиотиков. Классификация антибиотиков по происхождению, методам получения.
4) Классификация антибиотиков по спектру и характеру действия.
4) Классификация антибиотиков по механизму действия
5) Классификация антибиотиков по химическому строению.
6) Принципы рациональной антибиотикотерапии.
7) Осложнения и ошибки антибиотикотерапии.
8) Антибиотикорезистентность микроорганизмов. Причины формирования, механизмы, меры предупреждения.

9) Методы определения чувствительности микробов к антибиотикам.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Выписать основные группы β–лактамных антибиотиков с примерами:
2. Выписать побочные эффекты антибиотиков
3. Перечислить причины антибиотикорезистентности микроорганизмов
4. Ознакомиться с механизмами и характером действия отдельных групп антибиотиков, представленными в таблице 1.

Таблица 1

Тип действия антибиотиков

Бактерицидное	Бактериостатическое
пенициллин цефалоспорины аминогликозиды ванкомицин полимиксины рифампицин	тетрациклины левомицетин макролиды линкомицин фузидин циклосерин

5. Составить таблицу по классификации антибиотиков:

По происхождению	По характеру действия	По спектру действия	По химической структуре

ЛИТЕРАТУРА:

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
4. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
5. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Учесть результаты изучения влияния высокой температуры на спорообразующие и неспорообразующие бактерии.

Оснащение:

1) пробирки с посевами на жидкой питательной среде;
2) контрольная пробирка с культурой *B. anthracoides*;
3) контрольная пробирка с культурой *E. coli;*

Методика

Учет результатов производят по наличию или отсутствию признаков роста (помутнение, пленка, осадок).

На основании полученных результатов сделать вывод о чувствительности спорообразующих и неспорообразующих бактерий к действию высокой температуры.

2. Учесть результаты изучения действия УФ-лучей на спорообразующие и неспорообразующие бактерии.

Оснащение:

1) чашка с посевом *B. anthracoides;*
2) чашка с посевом *E. coli.*

Методика

Учет производят по наличию или отсутствию роста микробов в области, подвергшейся УФ-облучению. На основании полученных результатов сделать вывод о чувствительности спорообразующих и неспорообразующих бактерий к действию УФ-лучей.

Схему зарисовать в рабочую тетрадь.

3 Учесть результаты изучения действия дезинфицирующих средств на спорообразующие и неспорообразующие бактерии.

Оснащение:

1) чашка с посевом *B. anthracoides* с наложенными дисками;
2) чашка с посевом *E. coli* с наложенными дисками.

Методика

Учет производят по диаметру зоны задержки роста микробов вокруг дисков:

- 25 мм и более – чувствительность высокая;
- 15-25 мм - чувствительность средняя,
- 15 мм и менее - низкая чувствительность.

На основании полученных результатов необходимо сделать вывод о чувствительности спорообразующих и неспорообразующих бактерий к действию изученных растворов дезинфицирующих средств.

4. Определить чувствительность белого стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков.

Оснащение:

1) пробирка с культурой белого стафилококка на МПБ;
2) чашка с МПА;
3) бактериологическая петля;
4) спиртовка, спички;
5) восковой карандаш;
6) шпатель;
7) диски, пропитанные растворами антибиотиков;
8) пинцет.

Методика

Производят посев изучаемой культуры на плотную питательную среду (МПА) «газоном» с помощью шпателя. На засеянную поверхность помещают диски, пропитанные раствором антибиотиков на расстоянии друг от друга и от края чашки не менее 25 мм. Чашки помещают в термостат при t 37ºС на 24 часа. Учет производят по диаметру зоны задержки роста микробов вокруг дисков:

- 25 мм и более – чувствительность высокая;
- 15-25 мм - чувствительность средняя,
- 15 мм и менее - низкая чувствительность

5. Определить чувствительность белого стафилококка к фитонцидам высших растений методами «лунки» и «летучих фракций»

Оснащение:

1) пробирка с культурой белого стафилококка на МПБ;
2) чашка с МПА;
3) бактериологическая петля;
4) спиртовка, спички;
5) восковой карандаш;
6) шпатель;
7) свежие растения
8) скальпель;
9) пинцет.

Методика

Определение противомикробной активности фитонцидов *Allium sativum*.

а) Метод «колодца» («лунки»).

Исследуемая культура засевается в чашку Петри с МПА шпателем «газоном». На засеянной поверхности вырезают скальпелем и удаляют пинцетом кусочек агара площадью примерно 1 $см^2$ в виде квадрата или треугольника. В образовавшуюся лунку помещают кашицу мелко нарезанного растения. Посевы помещают в термостат на 24 часа при t 37°. Учет производят по диаметру зоны задержки роста микробов вокруг дисков:

- 25 мм и более – чувствительность высокая;
- 15-25 мм - чувствительность средняя,
- 15 мм и менее - низкая чувствительность

б) Метод «летучих фракций»

Исследуемая культура засевается в чашку Петри с МПА шпателем «газоном». Кашица мелко нарезанного растения, содержащего эфирные масла (чеснок), помещается в виде компактной кучки на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри (чашку не переворачивать). Посевы помещают в термостат на 24 часа при t 37°.

Учет производят по размеру диаметра зоны задержки роста микробов напротив кучки нарезанного растения. Параметры учета аналогичные.

6. Ознакомиться с различными противомикробными химиотерапевтическими препаратами по демонстрационным образцам.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

Химиотерапевтические средства – лекарственные препараты, избирательно подавляющие жизнедеятельность и уничтожающие микроорганизмы в организме человека.

Антибиотики – химиотерапевтические средства, продуцируемые микроорганизмами, животными, растениями, либо получаемые путем химического синтеза и обладающие способностью избирательно подавлять жизнедеятельность или уничтожать патогенные микроорганизмы.

Принципы рациональной антибиотикотерапии:

- микробиологический;
- фармакологический;
- клинический;
- эпидемиологический;
- фармацевтический;
- принцип адекватного комбинирования;
- постмаркетинговый/постпродажный.

А**нтибиотикорезистентность –** эволюционно сложившаяся (П. Эрлих) способность микроорганизмов сохранять жизнедеятельность в присутствии терапевтических доз антибиотика

Виды устойчивости:

1) природная (врожденная) – характеризуется отсутствием у микроба мишени действия антибиотика. Природная резистентность является постоянным видовым признаком. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики не эффективны. Например, пенициллин не действует на микоплазмы, т. к. у них нет пептидогликана – мишени, на которую этот антибиотик влияет.

2) приобретенная – возникает, когда в популяции микроорганизмов появляются особи, устойчивые к терапевтическим концентрациям антибиотика. Виды приобретенной устойчивости:

а) хромосомная – когда возникновение антибиотикорезистентности связано с изменением бактериальной хромосомы в результате мутаций. В этом случае обычно возникает устойчивость к одному виду антибиотика. Передается хромосомная устойчивость при всех видах генетического обмена.

б) внехромосомная (плазмидная) устойчивость – связана с наличием R-плазмиды – фактора множественной лекарственной резистентности.

R-плазмиды – внехромосомные генетические структуры бактерий, представляют собой замкнутые кольца двунитчатой ДНК. R-плазмида несет сразу несколько генов, ответственных за устойчивость к нескольким антибиотикам. Плазмида может передаваться от бактерии к бактерии с помощью конъюгации или трансдукции; возможна и межвидовая передача.

Механизмы антибиотикорезистентности:

1. Нарушение проницаемости клеточной стенки (полная или частичная утрата пориновых каналов, через которые проникает антибиотик);
2. Модификация мишени действия (Например, мишенью действия бета-лактамных антибиотиков является ПСБ – фермент, который участвует в синтезе клеточной стенки. При модификации этого фермента уменьшается его сродство к бета-лактамам, антибиотик перестает действовать);
3. Инактивация антибиотика (чаще всего за счет образования ферментов пептидаз, вызывающих гидролиз антибиотика. Например, 60-80% стафилококков продуцирую бета-лактамазы, разрушающие пенициллины).
4. Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс) – у некоторых бактерий существуют специальные транспортные системы для выведения антибиотика.

Лабораторное занятие №7

Тема: МИКРОФЛОРА ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ПОЧВЫ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: Ознакомиться с микрофлорой различных субстратов (почвы, воздуха, воды, предметов обихода) и организма человека. Ознакомиться с методами микробиологических исследований воды, воздуха, почвы, методами изучения экотопов организма человека. Закрепить теоретические знания по санитарно-микробиологическим исследованиям объектов окружающей среды.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Качественный и количественный состав микрофлоры почвы. Санитарно-бактериологического исследования почвы.
2. Роль микробов в круговороте азота и углерода в природе.
3. Качественный и количественный состав микрофлоры воды. Санитарно-гигиенические требования к качеству питьевой воды.
4. Микрофлора воздуха методы исследования.
5. Роль микрофлоры внешней среды в работе провизора и в возникновении и передаче инфекций.
6. Микрофлора организма человека. Понятия эубиоза, дисбиоза. Препараты для лечения дисбиоза.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1) Составить схемы круговорота азота и углерода в природе.
2) Выписать основные санитарно-показательные микроорганизмы воды, воздуха, почвы.
3) Выписать определения понятий и нормативы по СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода:
общее микробное число (ОМЧ), термотолерантные колиформные бактерии, сульфитредуцирующие клостридии, цисты лямблий, коли-фаги.
4) Выписать функции микрофлоры организма человека.
5) Составить таблицу по бактерийным препаратам на основе нормальной микрофлоры кишечника человека.
6) Решить ситуационные задачи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология/ Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
2. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова. - М.: Медицина, 1994. – 288 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина, 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы

микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

Таблица

Бактерийные препараты из нормальной микрофлоры кишечника человека

№	Название препарата	Состав	Лекарственная форма	Показания к применению	Способ введения
1	Лактобактерин сухой lactobacterinum siccum	Лиофилизированная масса живых антагонистически активных лактобактерий	Таблетки, ампулы, флаконы	-хронические колиты -дисбактериоз -состояние реконвалесценции после дизентерии и колиэнтеритов -бактериальные кольпиты, вызванные стафилококком и кишечной палочкой -нарушение чистоты вагинального секрета до3-4 стадии у беременных группы риска	-через рот (при кишечных заболеваниях) - интравагинально (при гинекологических заболеваниях)
2	Колибактерин сухой *colibarterinum siccum*				
3	Бифидумбактерин				
4	Бификол				
5	Бактисубтил				
6	Бифилиз				
7	Линекс				

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Учет результатов определения чувствительности белого стафилококка к антибиотикам методом бумажных дисков, к фитонцидам различных растений методом лунки, летучих фракций

Оснащение:

1) чашки с посевами культуры белого стафилококка для определения чувствительности методом бумажных дисков,

2) чашки с посевами культуры белого стафилококка для определения чувствительности к фитонцидам различных растений методом лунки, летучих фракций

Методика

Учет результатов производят по диаметру зоны задержки роста вокруг диска (лунки). Условные критерии: до 15 мм – чувствительность низкая, 16-25 мм - чувствительность средняя, более 25 мм – чувствительность высокая.

На основании полученных результатов сделать вывод о чувствительности белого стафилококка к действию антибиотиков, фитонцидов.

2. Посев водопроводной воды для определения микробного числа.

Оснащение:

1) пробирки с водопроводной водой:
2) 2 чашки Петри стерильные,
3) 2 пробирки с расплавленным МПА,
4) восковой карандаш,
5) спиртовка, спички,
6) пипетка (1 мл).
7) чашки с результатами посевов

Методика

Посев изучаемых образцов воды осуществляется в двух повторах. Стерильной пипеткой забирают 1 мл исследуемой пробы воды и вносят в стерильную чашку Петри, слегка приоткрывая крышку. Затем той же пипеткой снова забирают 1 мл воды из пробирки, помещают во вторую чашку Петри. После внесения воды в каждую чашку вливают 8 - 12 мл расплавленного и остуженного до 45-49°С питательного агара после фламбирования (обжигания над пламенем спиртовки) края посуды, в которой он содержится. Затем быстро смешивают содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки. Эту процедуру производят на горизонтальной поверхности, где чашки оставляют до застывания агара.

Расплавленный агар на период проведения анализа помещают в водяную баню, поддерживающую температуру 45-49°С. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 37°С в течение 24 ч.

Учет результатов: подсчитывают все выросшие на чашке колонии, находят среднее арифметическое, что и будет являться микробным числом воды - количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды.

3. Посев пробы воздуха седиментационным методом (по Коху) и аспирационным (по Кротову).

Оснащение:

1) прибор Кротова,
2) 2 чашки Петри с МПА,
3) таблицы: - «Определение микробного числа воздуха»,
- «Расчет числа бактерий в 1 $м^3$ воздуха».

Методика

1.Определение микробного числа по Коху (седиментационный метод).

Чашку Петри с МПА оставляют открытой на столе в течение 10 мин. Микробы из воздуха оседают, при росте образуются колонии.

Учет результатов: объем исследуемого воздуха неизвестен, поэтому количество выросших колоний умножают на коэффициент, который рассчитан в зависимости от диаметра чашки Петри (см.

МЧ = n×k, где n - количество колоний, k - коэффициент пересчета.

2.Определение микробного числа воздуха по Кротову (аспирационный метод).

Прибор Кротова позволяет протягивать определенный объем исследуемого воздуха над вращающейся чашкой Петри с питательной средой (аспирация). При этом струя воздуха ударяется о поверхность МПА, микробы принудительно оседают. Рекомендуемый объем воздуха для определения микробного числа воздуха – 100 л, грибов – 250 л, стафилококка – 250 л.

Учет результатов: микробное число воздуха находят по формуле:

МЧ= n × k

где n - количество выросших колоний, k - коэффициент пересчета на 1000 л. (k= 10 для микробного числа, k=4 для подсчета количества грибов, стафилококков).
Сделать вывод о сопоставимости методов (таблица 3 , занятие №8).

4. Изучение микрофлоры полости рта с помощью мазка из зубного налета.
Оснащение:
1) предметные стекла,
2) раствор колларгола,
3) микроскоп,
4) иммерсионное масло,
5) таблицы: - «Мазок из зубного налета»,
- «Микрофлора полости рта»,
6) демонстрационный препарат: «Зубной налет».

Методика

На предметное стекло помещают каплю колларгола. С помощью не серного конца спички берут налет (из кариесных зубов, промежутков между зубами) и перемешивают с каплей колларгола, распределяют другим стеклом (по типу мазка крови) или спичкой равномерно. Колларгол водой не смывают, высушивают на воздухе.
Микроскопическая картина: желтый или коричневый фон, бесцветные микробные клетки (негативный метод). Фон можно окрасить тушью. Можно окрасить препарат по Граму.
Зарисовать с таблицы мазок из зубного налета.

окраска колларголом

окраска по Граму

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК
1. Понятие аутохтонной и аллохтонной микрофлоры
2. Функции нормальной микрофлоры организма человека
3. Понятие дисбиоза, препараты коррекции

1. Понятие аутохтонной и аллохтонной микрофлоры

Микроорганизмы распространены повсеместно. В окружающей среде, организме животных и человека они встречаются в виде биоценозов, представляющих собой совокупность микробных популяций, различных по численности и видовому составу. В зонах обитания микроорганизмы образуют **биоценозы** [от греч. bios, жизнь, + koinos, сообщество] — сложные ассоциации со специфическими и часто необычными взаимоотношениями. Каждое микробное сообщество в конкретном биоценозе образуют специфичные **аутохтонные микроорганизмы** [от греч. autos, свой, + chthon, страна, местность], то есть микробы, присущие конкретной области. В состав этих сообществ могут внедрятся **аллохтонные микробы** [от греч. alios, чужой, + chthon, страна; буквально — чужестранец] (например, паразитические), обычно в них не встречающиеся. Естественные среды обитания большей части организмов — вода,

почва и воздух. Число микроорганизмов, обитающих на растениях и в организмах животных, значительно меньше.

Микрофлора животных и человека способствует поддержанию здорового статуса организма хозяина. Термин «**нормальная микрофлора**» объединяет микроорганизмы, более или менее часто выделяемые из организма здорового человека. Существует облигатная (резидентная), постоянная часть, сложившаяся в процессе эволюции, и факультативная или транзиторная.

2. Функции нормальной микрофлоры организма человека

Нормальная микрофлора обеспечивает колонизационную резистентность организма, т.е. невозможность размножения условно-патогенных и патогенных микроорганизмов на коже и слизистых оболочках. Нормофлора и, прежде всего, флора кишечника оказывает существенное влияние на все стороны жизнедеятельности организма человека, участвуя в поддержании гомеостаза, механизмах адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Антагонистические свойства представителей нормальной флоры кишечника по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам являются одним из факторов естественной невосприимчивости к инфекционным заболеваниям. Основной механизм – избирательное связывание нормальной микрофлорой рецепторов эпителиальных клеток. Антибиотическое действие возникает в результате секреции кислот, спиртов, лизоцима, бактериоцинов и других веществ. Кроме того, высокая концентрация указанных продуктов замедляет метаболизм и выделение токсинов патогенными видами. Особенно ярко выражены антагонистические свойства у бифидо- и лактобактерий. Доказана защитная роль микрофлоры кишечника, ее антагонистическая, витаминообразующая, ферментативная и др. функции. Кроме того, нормальная микрофлора – неспецифический стимулятор («раздражитель») иммунной системы. Отсутствие нормального микробного биоценоза вызывает многочисленные нарушения в иммунной системе.

3. Понятие дисбиоза, препараты коррекции

Состав микробных сообществ полостей организма зависит от различных факторов: состав и качество пищи, курение и употребление алкоголя, образ жизни, нормальная перистальтика и своевременное опорожнение кишечника и мочевого пузыря, качество пережёвывания пищи и даже характер трудовой деятельности (сидячий или иной). Наибольшее воздействие оказывают заболевания, связанные с изменениями физико-химических свойств эпителиальных поверхностей и приём антимикробных препаратов широкого спектра. В результате выживают более устойчивые виды — стафилококки, кандиды и грамотрицательные палочки (энтеробактерии, псевдомонады). Следствие этого — стойкие нарушения микробных ценозов — дисбактериозы или дисбиозы, которые, в свою очередь, могут привести к развитию инфекционных заболеваний (стафилококковый сепсис, системный кандидоз и псевдомембранозный колит).

Основными клиническими проявлениями дисбиоза кишечника являются: нарушение общего состояния (интоксикация, обезвоживание), снижение массы тела, симптомы поражения слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, нарушения пищеварения. Спектр клинических синдромов и патологических состояний, патогенез которых, связан с изменением состава и функции микрофлоры кожи и слизистых, следующий: диарея, запор, колиты, гастрит, дуодениты, язвенная болезнь, ишемия, гипо- и гиперхолестеринемия, ревматоидный артрит, некоторые злокачественные образования, кариес, мочекаменная болезнь, дерматиты, аллергии, поражения печени, суперинфекция, сепсис и др.

Лечение дисбиоза должно осуществляться в составе и с учетом особенностей основного заболевания. Оно включает: 1) устранение избыточного бактериального обсеменения кишечника условно-патогенной микрофлорой (селективная деконтамина-

ция), 2) восстановление нормальной микробной флоры, 3) стимулирование реактивности организма.

Коррекция кишечного дисбиоза осуществляется такими путями, как:

- использование живых микроорганизмов, относящихся к нормальным обитателям кишечника (пробиотики),
- использование селективных стимуляторов роста нормальной микрофлоры (пребиотики),
- создание благоприятных условий среды обитания микробиоценоза.

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, которые оказывают при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через восстановление функции его нормальной микрофлоры. Пробиотики не имеют противопоказаний к применению, не вызывают побочных реакций и предназначены для коррекции микрофлоры хозяина и лечения ряда заболеваний. Основоположником концепции пробиотиков является И.И. Мечников, который еще в 1903 году предложил практическое использование микробных культур-антагонистов для борьбы с болезнетворными бактериями.

Выделяют 5 поколений пробиотиков

1. Монокомпонентные препараты - состоят из штамма одного микроорганизма — представителя нормальной микрофлоры кишечника (бифидумбактерин, лактобактерин, колибактерин).
2. Препараты, не заселяющие кишечник, а конкурентно вытесняющие условно-патогенные и патогенные микроорганизмы на основе B. subtilis и B. cereus (споробактерин, бактисубтил, субтилин).
3. Поликомпонентные препараты или симбиотики - состоят из нескольких штаммов бактерий (линекс, ацилакт сухой, бификол)
4. **Синбиотики** - содержат штаммы бактерий нормальной флоры кишечника, с добавлением стимуляторов роста и метаболитов (пребиотиков) (бифиформ, биовестин-лакто, бифидобак, ламинолакт, ацилпол).
5. Комбинированные препараты (бифилиз).

Пребиотики - не перевариваемые в кишечнике ингредиенты различного происхождения, способные избирательно стимулировать рост и активность представителей микробиоценоза (селективный субстрат). Пребиотическими свойствами обладают следующие группы соединений:

1) олигосахариды (глюкоза, галактоза, лактулоза),
2) полисахариды (декстрин, инулин),
3) моносахариды (ксилит, раффиноза),
4) аминокислоты (валин, аргинин),
5) пищевые волокна (пектин, целлюлоза, лигнин) и др.

На основе указанных соединений созданы лекарственные препараты (дюфалак, эубикор, хилак-форте, лактофильтрум), детские смеси (Нутрилон-Омнео, Мамекс), биологически активные добавки к пище (пептидол-ПЭГ).

Лабораторное занятие №8

Тема: МИКРОБНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: ознакомиться с болезнями лекарственных растений, признаками микробной порчи лекарственного сырья и готовых лекарственных препаратов, изучить требования, предъявляемые к микробиологической чистоте различных категорий готовых лекарственных средств (ГФ XIII); этапы и схему бактериологического метода исследования по дням. Овладеть методами учета результатов санитарно-бактериологического исследования воды и воздуха, методами исследования микробиологической чистоты лекарственных средств.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Микробная контаминация лекарственных препаратов, источники и пути загрязнения, признаки негодности. Мероприятия по снижению и предупреждению микробного загрязнения лекарственных препаратов, санитарный режим в аптечных учреждениях.
2. Роль микробов ризосферы в жизни растений. Болезни лекарственных растений, вызываемые фитопатогенными бактериями, грибами, вирусами. Меры борьбы с болезнями растений (карантинные, физико-химические и биологические).
3. Меры предупреждения и условия хранения лекарственного растительного сырья.
4. Микрофлора нестерильных лекарственных форм. Испытание на микробиологическую чистоту. Требования ГФ РФ к микробиологической чистоте ЛС.
5. Понятие о бактериологическом методе исследования. Понятие о чистой культуре и колонии микроорганизмов, методы выявления чистых культур. Свойства бактерий, необходимые для определения вида.
6. Схема выделения чистых культур по дням исследования. Цель и сущность 1 дня исследования.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Указать источники микробной контаминации лекарственных препаратов и сырья.
2. Перечислить группы микроорганизмов, определяемые в готовых лекарственных средствах (см. Приложение №1 рабочей тетради).
3. Ознакомиться с болезнями растений по гербарию «Фитопатология».
4. Изучить схему бактериологического метода диагностики.
5. Ознакомиться с нормативной документацией:

а) Государственная Фармакопея РФ. Т.1. – 13-е изд., доп. – М., 2015

б) Приказ №309 от 21.10.97 "Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных учреждений".

в) Методические указания по микробиологическому контролю в аптеках. - МУ 3182-84.

Выписать основные положения НД.

6. Ознакомится с основными питательными средами, применяемыми в фармацевтической микробиологии (для определения качества лекарственных препаратов по микробиологическим показателям) – №1-№10 дать характеристику по назначению, консистенции.
7. Заполнить таблицу 1 «Этапы бактериологического метода исследования»

Таблица 1

Этапы бактериологического метода исследования

Этап бактериологического метода	Характеристика этапа	День исследования
I		
II		
III		

ЛИТЕРАТУРА:

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Государственная Фармакопея РФ. Ч.1. – 12-е изд., доп. – М.: Медицина, 2008, раздел «Биологические методы контроля», с.150-194
3. Приказ №309 от 20.10.97 "Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных учреждений".
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Учесть результаты определения микробного числа воздуха седиментационным и аспирационным методами, микробного числа воды.

Оснащение:

1) чашки с посевами
2) линейка

Методика

а) определение микробного числа воздуха седиментационным методом

Произвести подсчет количества выросших колоний, умножить на коэффициент, который определяется в зависимости от диаметра чашки Петри:

МЧ = n×k, где n - количество колоний, k - коэффициент пересчета.

Таблица 2

Расчет коэффициента при определении микробного числа воздуха седиментационным методом

№	Диаметр чашки, см	Коэффициент
1	8	100
2	9	80
3	10	60
4	11	50

Полученные результаты внести в таблицу 3.

б) Определение микробного числа воздуха по Кротову (аспирационный метод).

Произвести подсчет количества выросших колоний. Микробное число воздуха находят по формуле:

МЧ= n × k

где n - количество выросших колоний, k - коэффициент пересчета на 1000 л. (k= 10 для микробного числа, k=4 для подсчета количества грибов, стафилококков).

Полученные результаты внести в таблицу 3. Сделать вывод о сопоставимости методов.

Таблица 3

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха. Определение микробного числа.

Метод исследования	Время посева /объем воздуха	Количество колоний	Микробное число
По Коху	10 мин		
По Кротову	0,1 $м^3$		

в) **Определение микробного числа воды**

Произвести подсчет колоний, найти среднее арифметическое, что и будет являться микробным числом воды - количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды.

Сделать вывод о соответствии требованиям НД.

2. Определить микробиологическую чистоту таблеток глубинным методом.

Оснащение:

3) таблетки,
4) фосфатный буфер с pH=7,0,
5) стерильная фарфоровая ступка с пестиком,
6) спиртовка, спички,
7) стерильные пипетки на 1,0 и 10,0 мл,
8) 2 пробирки со средой №8,
9) 3 пробирки с 9 мл среды №3,
10) пробирка с расплавленным питательным агаром (среда №1),
11) пробирка с расплавленным агаром Сабуро (среда №2),
12) 2 стерильные чашки Петри

Методика

Определение микробиологической чистоты таблеток глубинным методом.

Приготовить исходное разведение (ИР): 1,0 г таблеток растереть в фарфоровой ступке, залить 10 мл фосфатного буфера с pH=7,0 (разведение 10^{-1})

1. Определение бактерий.

Приготовить дополнительные разведения ИР 10^{-2} ,˙ помещая 1 мл предыдущего разведения в 9 мл фосфатного буфера.

1 мл раствора (разведение 10^{-2}) перенести с соблюдением правил асептики стерильной пипеткой в стерильную чашку Петри, внести 8-12 мл расплавленного и остуженного до 45-49°С МПА, перемешать и после застывания агара поместить в термостат. Посевы выдерживают 5 суток при 32±2,5°С.

2. Определение грибов.

По 1 мл ИР перенести в стерильную чашку Петри, внести 8-12 мл расплавленного и остуженного до 45-49°С агара Сабуро, перемешать и после застывания агара поместить в термостат. Посевы выдерживают 5 суток при 22±2,5°С.

Учет производят по количеству выросших колоний, умноженных на 10 (т.к. изучаемый препарат был разведен в 10 раз).

3. Определение количества энтеробактерий

ИР в количестве 1 мл (соответствует 0,1 г или 0,1 мл образца) внести в первую пробирку, тщательно перемешать и перенести 1 мл (соответствует 0,01 г или 0,01 мл образца)

во вторую пробирку, снова перемешать и перенести 1 мл (соответствует 0,001 г или 0,001 мл образца) в третью пробирку. Посевы инкубировать в течение 24 – 48 ч.

4. Определение наличия E. coli.

ИР в количестве 1 мл перенести в 10 мл среды №8. Посевы поместить в термостат при температуре 32±2,5°С на 18-24 часа.

5. Определение S. aureus

ИР в количестве 1 мл перенести в 10 мл среды №8. Посевы поместить в термостат при температуре 32±2,5°С на 24-48 часов.

6. Определение бактерий рода Salmonella

Перенести 1 г исследуемого образца в 10 мл среды №8. Посевы поместить в термостат при температуре 32±2,5°С на 18-24 часа.

Таблица 4

Показатели микробной контаминации лекарственных средств

Лекарственная форма_____

Препарат _____

Категория_____

Микробиологические показатели	Общее число аэробных бактерий (среда №1)	Общее число дрожжевых и плесневых грибов (среда №2)	Количество энтеробактерий	*E. coli.*	*S. aureus*	Бактерии рода *Salmonella*
Требования НД						
Испытуемый образец						
Вывод о соответствии						

Заключение _____

_____

____

3. Ознакомиться с протоколом исследования по выделению чистой культуры, заполнить в соответствии со схемой изучения.

СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

1 день. Посев исследуемого материала в чашки Петри с МПА, Сабуро.
Режим культивирования: 37° С 24 часа.

2 день. Изучение морфологии высших колоний по схеме. Приготовление и микроскопия препаратов, окрашенных по Граму, из каждого вида колоний с целью определения "подозрительной колонии" (интересующей исследователя). Посев культуры из подозрительной колонии на скошенный агар для накопления чистой культуры для 3 дня исследования.

Режим культивирования: 37° С 24 часа.

3 день Проверка чистоты выделенной культуры.
Изучение свойств выделенной чистой культуры:
- морфологии;

- тинкториальных;
- культуральных свойств;
- подвижности;
- наличия каталазы.

Посев на среды Гисса для изучения биохимических свойств.

Режим культивирования: 37° С 24 часа.

4 день. Учет результатов определения биохимических свойств. Определение вида выделенной чистой культуры.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ И ИЗУЧЕНИЮ ЕЕ СВОЙСТВ

1. Дата посева
2. Название исследуемого материала
3. Результаты бактериологического исследования

а) название питательной среды для посева. (1-й день исследования)

б) количество видов колоний. (2-й день исследования)

в) морфология колоний

№	Макроскопические исследования						Микроскопические исследования	
	размер	форма	прозрачность	цвет	поверхность	консистенция	край	структура
1								
2								
3								

г) данные микроскопии препаратов из колоний

№ 1_____

№ 2_____

№ 3_____

4. Высев из колонии № на скошенный агар для накопления чистой культуры. Дата.
5. Изучение чистоты и свойств выделенной чистой культуры (3-й день исследования)

а) проверка на чистоту

б) морфология

в) тинкториальные свойства

г) культуральные свойства

д) подвижность

е) каталаза

6. Посев на среды "пестрого ряда" (Гисса) для изучения биохимических свойств. Дата.
7. Учет результатов исследования биохимических свойств. (4-й день)

Сахаролитические свойства					Протеолитическая активность	
глюкоза	лактоза	мальтоза	маннит	сахароза	индол	сероводород

8. Заключение о виде выделенной чистой культуры

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Микрофлора нестерильных лекарственных форм
2. Микробиологические методы испытаний нестерильных лекарственных средств
3. Методы микробиологической диагностики

1. Микрофлора нестерильных лекарственных форм

Нестерильными называются лекарственные формы, в которых допускается определенное количество непатогенных микроорганизмов.

Процесс производства ЛП должен осуществляться в строгом соответствии с требованиями нормативной документации. Условия проведения технологического процесса должны обеспечивать его поточность, согласованность, безопасность и безаварийность работы технологического оборудования, оптимальную загрузку. Необходимо исключить или свести к минимуму контакты персонала с сырьем, упаковочным материалом, готовым продуктом в процессе его получения.

Источники микробной контаминации ЛП:

- сырье
- воздух
- посуда, упаковка
- вода
- рецепты
- персонал
- технологическое оборудование.

Предупреждение микробной порчи готовых лекарственных веществ возможно при соблюдении условий, снижающих их микробное загрязнение:

- технология производства,
- правила эксплуатации оборудования,
- правила получения, транспортировки и хранения воды очищенной,
- использование сырья и субстанций, соответствующих нормативам по микробиологической чистоте,
- режим хранения субстанций, сырья, промежуточных продуктов и т.п.,
- соответствующее санитарное состояние помещений и оборудования, качественное обеззараживание воздуха аптечных помещений,
- правила личной гигиены работников,

Соблюдение в аптеке санитарно-эпидемического режима регламентируется **приказом МЗ РФ №309 от 21.10.97 «Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных организаций (аптек)»**.

Загрязнение микроорганизмами может происходить на разных стадиях производства: при нарушении технологии их изготовления, контроля качества, хранения. Поэтому испытания на микробиологическую чистоту осуществляются на всех этапах получения ЛС.

Большое значение придается качеству *исходного сырья*. Все компоненты, входящие в состав ЛФ, подвергаются проверке на микробную контаминацию. Требования ГФ 12 изд. к субстанциям и вспомогательным веществам включают определение ОМЧ при отсутствии условно-патогенных микроорганизмов (кишечная палочка, сальмонеллы, золотистый стафилококк, синегнойная палочка). *Вода очищенная* должна соответствовать требованиям ФС 42-2619-97, содержать не более 50 КОЕ/мл. Храниться не более 3 суток в закрытых емкостях. *Вода для инъекций* используется свежеперегнанной и хранится в закрытых емкостях не более 24 часов. Качество воды регламентирует ФС 42-2620-97. Должна соответствовать испытаниям на воду очищенную, быть апирогенной и содержать не более 10 КОЕ/мл.

Первичная упаковка (флаконы, ампулы из стекла, бумага, пленки и т.д.) непосредственно контактирует с препаратом, поэтому перед фасовкой посуду моют, сушат и стерилизуют паровым методом или горячим воздухом.

2. Микробиологические методы испытаний нестерильных лекарственных средств

Объем микробиологических исследований

Нестерильные лекарственные формы (субстанции, формы, вспомогательные вещества) проходят испытания на **микробиологическую чистоту** (ГФ XII):

1. Общее число аэробных бактерий в 1 г/мл (посев на МПА).
2. Число плесневых и дрожжевых грибов (посев на агар Сабуро).
3. Бактерии группы кишечной палочки (посев на среду № 3).
4. Золотистый стафилококк и синегнойная палочка (посев на среду № 8).

Посев производится в асептических условиях двухслойным агаровым, глубинным методами.

Качественное определение санитарно-показательных микроорганизмов

1. Определение бактерий семейства Enterobacteriaceae (роды Escherichia, Salmonella, Shigella). При наличии роста на среде №3 производят посев лекарственных средств на среду Эндо и висмут-сульфитный агар. Идентификацию энтеробактерий осуществляют следующим образом: если в образце обнаружены грамотрицательные неспоровые палочки, дающие отрицательную реакцию на цитохромоксидазу, ферментирующие глюкозу и восстанавливающие нитраты в нитриты, исследуемый препарат содержит бактерии семейства Enterobacteriaceae.
2. Определение патогенных стафилококков.

Определение патогенных стафилококков производят при росте на среде №8 посевом лекарственного препарата на желточно-солевой агар. На этой среде патогенные стафилококки вызывают расщепление лецитина, проявляющееся в образовании вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. Выделенную чистую культуру исследуют на наличие плазмокоагулазы.

3. Выявление Pseudomonas aeruginosa.

Осуществляют при наличии признаков роста на среде №8 посевом на среду с глицерином. Синегнойная палочка на этой среде образует зеленоватые флуоресцирующие колонии, выделяющие в среду сине - зеленый пигмент.

Большая группа стерильных и нестерильных лекарственных средств обладает **противомикробной активностью**, например, ГЛС на основе антибиотиков, сульфаниламидов, нитрофуранов и др. Перед микробиологическим анализом таких ГЛС необходимо устранить их антимикробное действие путем добавления специфических (например, пенициллиназы для пенициллинов) и неспецифических (0,3-0,4% раствор твина-80 и твина-20, лецитин, гистидин) инактиваторов, увеличением рабочего разведения образца или использования метода мембранной фильтрации.

3. Методы микробиологической диагностики

1. Микроскопический – изучение окрашенного препарата с помощью микроскопа.
2. Биологический – заражение лабораторных животных исследуемым материалом с последующим установлением факта присутствия микробов или микробного токсина
3. Серологический – выявление специфических неизвестных антигенов или антител с помощью серологических реакций.
4. Аллергологический – выявление наличия повышенной чувствительности (сенсибилизации) организма путем введения аллергенов.

5. Культуральный (*бактериологический*, микологический, вирусологический и т.д.) – это:
- выделение чистой культуры из исследуемого материала,
- изучение свойств выделенной чистой культуры,
- определение вида микроорганизма.

Применение бактериологического метода:
- контроль качества препаратов,
- контроль санитарно-гигиенического режима в аптеках, больницах и т.д.,
- получение с помощью микроорганизмов лечебно-профилактических препаратов,
- диагностика инфекционных заболеваний,
- определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Характеристика бактериологического метода

Достоинства	Недостатки
- точный - ранний	- длительный

1 этап Выделение чистой культуры

Микробные культуры

Чистые	**Смешанные**
(содержат один вид микробов) -лабораторные культуры	(содержат несколько видов микробов) - пробы почвы, воды, воздуха - патологический материал и др.

В естественных условиях микробы живут в ассоциациях.
При исследовании микробов возникает необходимость выделения чистых культур из смешанных.

Методы выделения механические	биологические
основаны на принципе механического разделения микроорганизмов на питательных средах - метод Дригальского	основаны на биологических свойствах микроорганизмов: - использование элективных питательных сред, - заражение лабораторных животных

Колония – видимое невооруженным взглядом скопление микробов на плотной питательной среде, выросшей из одной клетки. Колония - это потомство микробов, выросших из одной клетки. Т.к. все микробы в колонии выросли из одной клетки, они относятся к одному виду, т.е. в каждой изолированной колонии (отдельно стоящей, не сливающейся с другими колониями) содержится ***чистая культура.***

2 этап Изучение свойств выделенной чистой бактериальной культуры
1. Морфология (форма, размер, расположение клеток в препаратах) изучается микроскопическим методом
2. Тинкториальные свойства – отношение к окраске, изучаются микроскопическим методом

3. Культуральные свойства – характер роста на питательных средах. На жидких питательных образуется осадок, пленка, помутнение, опалесценция.
На плотных средах вырастают колонии или сплошной налет (если много материала). Изучаются визуально.
4. Подвижность. Изучаются с помощью препаратов "висячей" и "раздавленной" капли, электронной микроскопии, окраски по Леффлеру.
5. Биохимические свойства – способность микробов расщеплять белки, углеводы и другие вещества. Изучаются с помощью посева на дифференциально-диагностические среды Гисса (жидкие), Эндо, Левина, Плоскирева (плотные) и др.
6. Антигенные или серологические свойства – способность микробов (антигенов) взаимодействовать с антителами иммунных сывороток. Изучают с помощью постановки серологических реакций: агглютинации, преципитации и др.
7. Патогенность – способность микробов вызывать инфекционные заболевания. Изучается с помощью заражения экспериментальных животных.

3 этап Определение вида

По совокупности изученных свойств с помощью определителя Берджи устанавливают вид выделенной чистой культуры: B. coli , S. aureus.
Схему выделения чистой культуры и изучения ее свойств по дням исследования см. в рабочей тетради.

Лабораторное занятие №9

Тема: МИКРОБНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ, ВТОРОЙ ДЕНЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: изучить источники и пути микробной контаминации готовых ЛС, санитарно-гигиенические требования к изготовлению нестерильных и стерильных ЛФ. Овладеть методами исследования СЛФ на стерильность. Освоить методы исследования во 2-й день выделения чистой культуры микроорганизмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Стерильные лекарственные формы: понятие, условия производства. Требования ГФ РФ.
2. Источники микробной контаминации СЛС. Мероприятия по предупреждению микробной контаминации лекарственных препаратов в аптечных учреждениях и на фармацевтическом производстве.
3. Испытания на стерильность, апирогенность.
4. Цель и сущность второго дня выделения чистых культур микробов.
5. Определение, характеристика и схема изучения колоний.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Перечислить требования, предъявляемые к стерильным и асептически изготовляемым лекарственным средствам (ГФ XIII) (см. Приложение №1 раб. тетради).

2. Указать преимущества метода мембранной фильтрации.

3. Перечислить санитарно-гигиенические требования к персоналу, занятому изготовлением стерильных лекарственных форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. - 208 с.
3 Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
4. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
5. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Определить стерильность инъекционного раствора/глазных капель методом прямого посева.

Оснащение:

1) инъекционный раствор,
2) глазные капли
3) 2 пробирки с тиогликолевой средой,

4) 2 пробирки с жидкой средой Сабуро,
5) стерильные пипетки на 1 мл,
6) спиртовка,
7) спички,
8) спиртовые ватные тампоны.

Методика

а) соблюдая условия асептики, перенести стерильной пипеткой по 1 мл инъекционного раствора (глазных капель) в пробирку с тиогликолевой средой (выявление бактерий). Посевы поместить в термостат на 14 суток при 32±2,5°С.
б) по 1 мл глазных капель (инъекционного раствора) перенести стерильной пипеткой в пробирку с жидкой средой Сабуро (выявление грибов).
Посевы выдержать 14 суток при 22±2,5°С.
Учет производится по наличию или отсутствию роста микробов визуально. Препарат считается удовлетворяющим требованиям ГФ-12 при сохранении прозрачности среды, что свидетельствует об отсутствии роста микроорганизмов.

2. Предварительный учет результатов определения микробиологической чистоты таблеток. Пересевы на дифференциально-диагностические среды.
Результаты внести в таблицы 1 в рабочей тетради (см. занятие №9).
Оснащение:
1) посевы на ПА (среда №1) для выявления бактерий;
2) посевы на агар Сабуро (среда №2) для выявления грибов;
3) 3 пробирки с посевами на среду №3 для выявления количества энтеробактерий;
4) 2 пробирки с посевами на среду №8 для выявления S. aureus и *E. coli.*
5) 1 пробирка с посевом на среду №8 для выявления бактерий рода *Salmonella*
6) чашка со средой Эндо;
7) пробирка со средой № 3;
8) чашка со средой №10 (маннитно-солевой агар);
9) пробирка со средой Раппопорта –Вассилиадиса.

Методика

Определение общего числа аэробных бактерий и общего количества грибов произвести по количеству выросших колоний на среде № 1 и №2 с учетом степени разведения (n×10, т.к. изучаемый препарат был разведен в 10 раз для грибов и n×100 для бактерий). Учет присутствия энтеробактерий, кишечной палочки, золотистого стафилококка и бактерий рода *Salmonella* произвести по визуальным признакам наличия или отсутствия роста (помутнение, пленка, придонный рост).
Определение количества энтеробактерий:
Для подтверждения отсутствия энтеробактерий, сделать пересев бактериологической петлей из каждой пробирки с видимым ростом на среду Эндо (среда № 4) и инкубировать чашки Петри в течение 18 – 24 ч. при температуре 32±2,5°С. При отсутствии роста определить наиболее вероятное количество энтеробактерий в 1 г образца по таблице.

Интерпретация результатов количество испытуемого образца

Количество испытуемого образца			НВЧ бактерий в 1 г образца
0,1 г(мл)	0,01 г(мл)	0,001 г(мл) (мл)	
1 мл ИР	1 мл ИР в разведении 1:10	1 мл ИР в разведении 1:100	
+	+	+	более 10^3
+	+	-	от 10^2 до 10^3
+	-	-	от10^1 до 10^2

-	-	-	менее 10^1

Определение наличия E. coli

При наличии роста на среде №8 0,1 мл содержимого перенести в 10 мл среды № 3 и инкубировать 24 – 48 ч при температуре (43 ± 1) °С.

Определение S. aureus

При наличии роста на среде №8 пересеять петлей на маннитно-солевой агар (или среду № 10) и инкубировать в стандартных условиях в течение 24 – 48 ч.

Определение бактерий рода Salmonella

При наличии роста на среде №8 0,1 мл перенести в 10 мл накопительного бульона для бактерий рода *Salmonella* – среду Раппопорта –Вассилиадиса и инкубировать в стандартных условиях в течение 18 – 24 ч.

3. Продолжить работу по выделению чистой культуры бактерий (II день выделения чистой культуры).

а) Просмотреть чашки с посевами, определить количество видов колоний, наметить для детального изучения по одной изолированной колонии каждого вида.

б) Описать морфологические свойства колоний. Данные внести в протокол исследования.

Оснащение:

1) чашки с посевами,
2) микроскоп,
3) восковой карандаш,
4) бактериологическая петля,
5) спиртовка, спички.

Методика

Морфологические свойства колоний описать в соответствии со схемой изучения колоний

Морфология колоний

№	Макроскопические исследования						Микроскопические исследования	
	размер	форма	прозрачность	цвет	поверхность	консистенция	край	структура
1.								
2.								
3.								

в) Из каждой описанной колонии приготовить мазок, окрасить по Граму, промикроскопировать. Выявить колонию, содержащую грамотрицательную мелкую палочку.

Оснащение:

1) чашки с посевами,
2) бактериологическая петля,
3) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
4) набор красок для окраски по методу Грама (фиолетовые фильтровальные бумажки, пропитанные генциановым фиолетовым,
5) кювета с мостиком,
6) колба с водой,
7) иммерсионное масло,
8) восковой карандаш,
9) микроскоп,
10) спиртовка, спички
11) таблица «Методика окраски по Граму»,

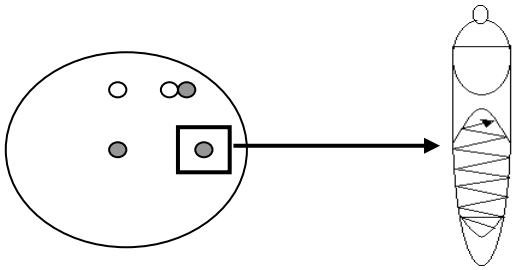
г) Произвести высев материала из колонии, содержащей мелкую грамотрицательную палочку на скошенный агар (ПА) для накопления чистой культуры. Пробирки с посевами поместить в термостат.

Оснащение:

1) чашки с посевами,
2) бактериологическая петля,
3) пробирки со скошенным агаром
4) спиртовка, спички
5) термостат.

Методика

См. методику приготовления мазка (занятие №2) и технику посева и пересева микроорганизмов (занятие №4).



ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Методы испытаний стерильных лекарственных препаратов
2. Правила изготовления ЛС

1. Методы испытаний стерильных лекарственных препаратов

Стерильные лекарственные средства не содержат жизнеспособных микроорганизмов. Стерильные лекарственные формы готовят в асептических условиях с последующей стерилизацией в конечной упаковке.

К стерильным лекарственным средствам относятся препараты:

- для инъекций и инфузий;
- офтальмологические (глазные капли и мази);
- наносимые на открытые раны, ожоги;
- для введения в полости тела, которые не содержат микроорганизмов;
- лекарственные препараты для новорожденных.

В эту категорию входят и *асептические лекарственные формы,* которые готовят в асептических условиях без стерилизации в конечной упаковке:

- препараты для детей до 1 года,
- глазные мази на стерильной основе,
- лекарственные средства с антибиотиками,
- термолабильные лекарственные средства.

Объем микробиологических исследований

1. Испытания стерильных лекарственных форм на **стерильность**. Исследования проводятся фармакопейными методами в асептических условиях:

- прямого посева,
- мембранных фильтров.

Контроль стерильности лекарственных средств проводят с использованием жидких питательных сред. Для выявления бактерий используют тиогликолевую среду. Для обнаружения грибов применяют среду Сабуро. Признаком стерильности является отсутствие роста микробов.

Метод мембранных фильтров используют при определении стерильности лекарственных средств, обладающих выраженным противомикробным действием, и лекарствен-

ных средств, разлитых в ёмкости более 100 мл. Применение метода мембранной фильтрации основано на пропускании ЛС через полимерную мембрану. При этом микроорганизмы остаются на поверхности мембраны. Далее мембрану помещают в соответствующую питательную среду и наблюдают образование колоний при инкубировании. Для подсчета жизнеспособных микроорганизмов обычно используют мембраны из эфиров целлюлозы (нитроцеллюлозы, ацетоцеллюлозы и смешанных эфиров целлюлозы) с размером пор 0,45 мкм.

2. А**пирогенность и**нъекционных и инфузионных растворов (отсутствие пирогенных веществ и механических частиц).

Пирогены — вещества, вызывающие повышение температуры тела. Источниками пирогенов являются компоненты микробных клеток, сохранившихся после стерилизации (липополисахариды (эндотоксины) клеточных стенок грамотрицательных бактерий).

Основным методом определения пирогенности стерильных лекарственных средств, предусмотренным фармакопеями всех стран, является биологический метод in vivo и ЛАЛ-тест, который проводится in vitro.

2. Правила изготовления ЛС

основаны на принципах асептики - предупреждении попадания микроорганизмов в объект. Особое внимание уделяется процессу производства стерильных ЛФ, требующему специального комплекса мероприятий:

- организация асептических условий производства,
- соблюдение правил асептики,
- выбор методов и режимов стерилизации.

Стерильные лекарственные формы в аптечных учреждениях готовят в асептическом блоке, который отделен от остальных помещений шлюзом. В условиях заводского производства асептические условия создаются путем организации чистых зон или помещений (классов А и В).

Классификация помещений производства ЛС
(в соответствии с требованиями ГОСТ 52249-2004)

Класс чистоты	Технологические операции	Максимально допустимое количество микробов в 1 $м^3$ воздуха
A	- розлив растворов в ампулы, флаконы для получения инъекционных, инфузионных, глазных и др. стерильных ЛС - фасовка стерильных порошков - отбор проб стерильных продуктов	Менее 1
B	- стерилизующая фильтрация растворов - лиофильная сушка растворов - приготовление, фасовка и укупорка трансдермальных ЛС - хранение стерильных материалов первичной упаковки - хранение стерильной технологической одежды	10
C	- приготовление и предварительная фильтрация растворов - выгрузка ЛС после стерилизации - стерилизующая фильтрация дезинфицирующих растворов - разборка и мойка стерилизующих фильтров	100
D	- хранение готовой продукции - приготовление и предварительная фильтрация дез-	200-500

	инфицирующих растворов	

Подготовка производственных помещений включает комплекс мероприятий, состоящий из влажной уборки и дезинфекции стен, полов, рабочих поверхностей не реже 1 раза в смену, и направлен на достижение соответствующего уровня чистоты помещений. Технологический и вентиляционный воздух перед подачей в производственные помещения проходит специальную подготовку. Для обеззараживания воздуха в помещении используют бактерицидные ультрафиолетовые лампы.

Попадание микробов в СЛС может происходить и от работника в процессе технологического производства с выделениями из верхних дыхательных путей, контактным путем с рук, волос, одежды. В соответствии с приказом № 309 от 1997 г., работники должны быть здоровыми, прохождение мед. осмотров осуществляется не реже 1 раза в год. К изготовлению ЛФ не допускаются носители патогенных микробов, лица, страдающие кожными и аллергическими заболеваниями. Временно отстраняются от производства СЛС сотрудники, имеющие загар. Персонал обязан выполнять правила личной гигиены, соблюдать санитарный режим, иметь склонность к чистоте и порядку. Работник, занятый изготовлением СЛС, в шлюзе асептического блока надевает стерильный комплект одежды, в который входят халат, шапочка, марлевая повязка, бахилы. Перед работой проводится антисептика кожи рук разрешенными к применению растворами (этиловый спирт 76%, йдопирон 1%, хлоргексидина биглюконата 0,5% раствор в 70% этаноле (гибитан), хлорамин 0,5%, дегмин, клиндезин, лизанин и др.).

Выбор способа стерилизации лекарственного препарата определяется степенью устойчивости компонентов растворов к нагреванию. Некоторые инъекционные растворы не выдерживают термической стерилизации. При заводском производстве таких растворов используют стерилизацию фильтрованием или гамма-лучами. В случае аптечного производства лекарственную форму с термолабильным компонентом готовят в асептических условиях.

Лабораторное занятие №10

Тема: МИКРОБНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В АПТЕКАХ. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ, ТРЕТИЙ ДЕНЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: знать задачи и объекты микробиологического контроля в аптеках и на фармацевтическом производстве; нормативную документацию, регламентирующую микробиологический контроль в аптечных учреждениях и на фармацевтическом производстве. Овладеть методом санитарно-бактериологического исследования смывов с объектов внешней среды и рук персонала. Освоить методы исследования во 3-й день выделения чистой культуры микроорганизмов. Закрепить теоретические знания по микробиологическому контролю ЛП.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Микробиологический контроль в аптеках и на фармацевтическом производстве: виды, функции.
2. Объекты, методы и объемы исследования при микробиологическом контроле в аптеках и на фармацевтическом производстве. Отбор проб различных объектов микробиологического анализа.
3. Службы, осуществляющие контроль санитарного режима аптек и качества лекарств. Функции бактериологической службы.
4. Нормативные документы и требования к санитарно-микробиологическому состоянию исследуемых объектов в аптеках и на фармацевтическом производстве, к качеству лекарственных препаратов.
5. Цель и сущность 3 дня выделения чистых культур.
6. Методы изучения ферментативных (биохимических) свойств бактерий: сахаролитической и протеолитической активности. Дифференциально-диагностические среды Гиса: состав и цель использования.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Указать объекты микробиологического контроля в аптеках и на фармацевтическом производстве.
2. Указать определяемы показатели при микробиологическом контроле воздуха производственных помещений, рабочих поверхностей, кожи рук персонала.
3. Указать требования к воде очищенной и воде для инъекций в соответствии с ГФ 13.
4. Решить ситуационные задачи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
3 Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
5. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы

микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Получение смывов с поверхности стола (оборудования) и кожи рук, посев на среду Эндо для определения санитарно-показательного микроорганизма (*E. coli*).

Оснащение:

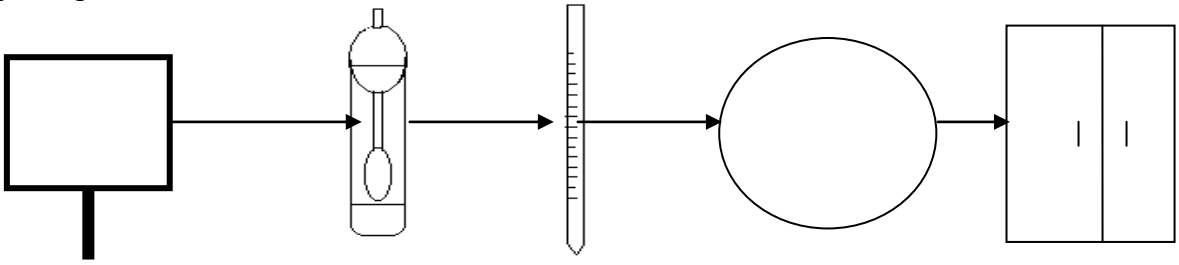
1) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
2) стерильные ватные тампоны,
3) чашка Петри со средой Эндо,
4) восковой карандаш,
5) спиртовка, спички.

Методика

Смыв производят стерильным ватным тампоном, помещенным в пробирку с изотоническим раствором хлорида натрия (до работы тампон не должен касаться жидкости). Перед взятием смыва тампон слегка погружают в изотонический раствор и делают смыв без учета площади. Материал, находящийся на тампоне, слегка втирают в поверхность среды Эндо. Каждый смыв делают новым тампоном.

Среда Эндо - это плотная дифференциально-диагностическая среда, состоит из МПА, 1% лактозы и основного фуксина, обесцвеченного в щелочной среде (сульфатом натрия). Исходная среда окрашена в светло-розовый цвет. При сбраживании лактозы образуется ацетальдегид, который реагирует с сульфитом и окрашивает колонии в ярко-красный цвет (темно-красные колонии с металлическим блеском или без него).

Для подтверждения наличия *E.coli* из колонии готовят окрашенный по Граму препарат и исследуют под микроскопом. В препаратах должна обнаруживаться грамотрицательная палочка.



Объект пробирка с тампоном петля чашка со средой термостат

2. Получение смывов с поверхности стола (оборудования) и кожи рук, посев на желточно-солевой агар для определения санитарно-показательного микроорганизма (S. aureus).

- Оснащение:

1) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
2) стерильные ватные тампоны,
3) чашка Петри со средой ЖСА,
4) восковой карандаш,
5) спиртовка, спички.

Методика

См. методику к работе 1.

3. Учет результатов определения микробиологической чистоты таблеток. Пересевы на дифференциально-диагностические среды. Результаты внести в таблицу 1 в рабочей тетради (см. занятие №9).

Оснащение:

1) чашка с посевом на среду Эндо;

2) пробирка с посевом на среду № 3;
3) чашка с посевом на среду №10 (маннитно-солевой агар);
4) пробирка с посевом на среду Раппопорта –Вассилиадиса;
5) чашка со средой Эндо;
6) чашка со висмут-сульфитным агаром (среда № 5);

Методика

Определение количества энтеробактерий:

При наличии типичных колоний (темно-малинового цвета с металлическим блеском) на среде Эндо (высев разведений) определить наиболее вероятное количество энтеробактерий в 1 г образца по таблице.

Интерпретация результатов количество испытуемого образца

Количество испытуемого образца			НВЧ бактерий в 1 г образца
0,1 г(мл)	0,01 г(мл)	0,001 г(мл) (мл)	
1 мл ИР	1 мл ИР в разведении 1:10	1 мл ИР в разведении 1:100	
+	+	+	более 10^3
+	+	-	от 10^2 до 10^3
+	-	-	от10^1 до 10^2
-	-	-	менее 10^1

Определение наличия E. coli

При наличии роста на среде №3 сделать высев петлей на среду Эндо и инкубировать 18-24 ч при стандартной температуре.

Определение S. aureus

Учесть результаты посева на маннитно-солевой агар. Наличие типичных золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами на среде с маннитом, свидетельствует о росте *S. aureus,* ферментирующем маннит. Отсутствие характерных колоний свидетельствует об отсутствии *S. aureus,*

Определение бактерий рода Salmonella

Сделать пересев со среды Раппопорта-Вассилиадиса бактериологической петлей на висмут-сульфитный агар (среда № 5) и инкубировать в течение 48 ч при стандартной температуре.

4. Продолжить работу по выделению чистой культуры бактерий (3–й день исследования). Заполнить протокол исследования по изучению чистоты и свойств выделенной культуры в рабочей тетради (см. занятие №9).

Оснащение:
1) пробирка с культурой бактерий на скошенном агаре,
2) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
3) предметное стекло - 2 шт.,
4) бактериологическая петля,
5) восковой карандаш,
6) спиртовка, спички,
7) набор красителей для окраски по методу Грама (фильтровальные бумажки, пропитанные генциановым фиолетовым, раствор Люголя, бюкс со спиртом, разведенный фуксин Пфейфера),
8) кювета с мостиком
9) колба с водой
10) микроскоп, иммерсионное масло
11) 3% раствор перекиси водорода, пипетка
13) зубочистка

а) Проверка чистоты выделенной культуры:

- макроскопически (визуально): сравнить характер роста культуры на скошенном агаре с характером роста исходной колонии (из которой делали пересев во 2-й день исследования). При идентичности роста предполагают, что культура чистая.
- микроскопически: готовят мазок из культуры со скошенного агара, причем материал берут со всей площади посева. Затем окрашивают по методу Грама. Под микроскопом исследуют 5-6 полей зрения.

Убедившись, что получена чистая культура, приступить ко второму этапу - изучению ее свойств.

б) Изучение свойств выделенной чистой культуры:

- морфологические свойства (форма и размеры клеток, расположение в препаратах),
- тинкториальные свойства,

работа выполняется при микроскопии окрашенного по Граму препарата одновременно с определением чистоты культуры,

- культуральные свойства - рост культуры на скошенном агаре (цвет, блеск, прозрачность налета),
- подвижность бактерий методами "висячей" и "раздавленной" капли (см. занятие №4),
- наличие каталазы.

Определение каталазы

На сухое чистое предметное стекло нанести полную петлю агаровой культуры. Пипеткой нанести на культуру 1 каплю 3% раствора перекиси водорода. Реактив можно нанести на стекло рядом с культурой, а затем перемешать зубочисткой. Ошибкой является внесение культуры **в каплю перекиси водорода** при помощи металлической петли, поскольку металл при контакте с перекисью водорода может вызвать ложноположительный результат.

При положительном результате пузырьки газа появятся практически мгновенно, вызывая "вскипание" реактива. Позднее образование пузырьков, а также их малое количество могут свидетельствовать о ложноположительном результате.

в) Посев чистой культуры, выросшей на скошенном агаре, в среды "пестрого ряда" (среды Гисса) для изучения сахаролитической и протеолитической активности.

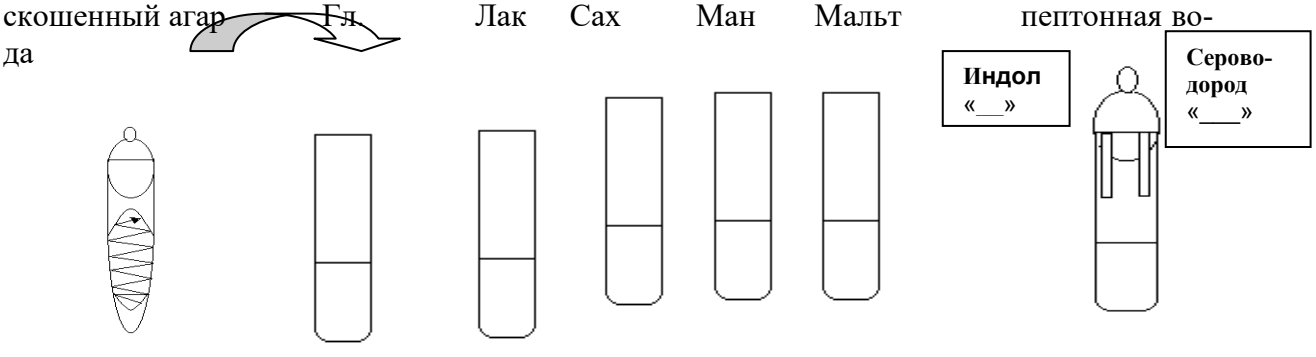
Оснащение:

1) пробирка с чистой культурой на скошенном агаре,
2) пробирки со средами Гисса,
3) индикаторные бумажки для определения индола и сероводорода (в чашке на столе преподавателя),
4) пинцет,
5) спиртовка, спички,
6) таблицы: «Ферментативная активность бактерий».

Методика

Произвести посев во все шесть пробирок «пестрого ряда»: перенести исследуемую культуру, соблюдая правила асептики, со скошенного агара в пробирки с жидкими средами (методика пересева - см. занятие №4). В стаканы поместить этикетку: № группы, фамилия.

Пробирки поместить в термостат на 24 часа при t37°С. Учет результатов по наличию или отсутствию признаков роста (см. информационный блок).



ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ К ЗАНЯТИЮ

Подготовиться ***к зачету по разделу «*Общая микробиология. Фармацевтическая микробиология»** в виде тестового контроля по следующим темам:

- Морфология микроорганизмов
- Физиология микроорганизмов
- Генетика микроорганизмов
- Действие физических и химических факторов на микроорганизмы, генетика и биотехнология
- Противомикробная химиотерапия
- Экология микроорганизмов. Микрофлора организма человека. Санитарно-бактериологическое исследование воды, воздуха, почвы
- Микробная контаминация лекарственных средств

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Понятие о системе обеспечения качества ЛП
2. Микробиологический контроль в аптечных учреждениях
3. Изучение биохимических свойств микроорганизмов

1. Понятие о системе обеспечения качества ЛП

Качество фармацевтических препаратов регламентировано междуна-родными стандартами. Специальное законодательство является унифицированным и отвечает имеющимся во всем мире нормативным правилам доклинических испытаний (**GLP**), фармацевтических исследований, клинической оценки **(GCP**), организации производства и последующего контроля качества ЛС (**GMP**). Именно на этих документах основывается нормативная база оценки эффективности, безопасности и обеспечения контроля качества ЛС в таких высокоразвитых странах, как США, Канада, Япония, страны ЕС.

Организация производства и обеспечение качества ЛС должны соответствовать «Правилам надлежащего производства» (Good Manufacturing Practices), сокращенно GMP. Данный свод документов носит системный и профилактический характер. Он направлен на предотвращение ошибок и отклонений путем учета всех факторов, способных повлиять на качество готовой продукции с самого начала и до окончания производственного цикла. Осуществление этих правил невозможно без должного внимания к санитарии и личной гигиене на производстве, к технологической и контрольной документации, без современного оборудования. Российские правила GMP изложены в **ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».** Правила распространяются на исходные материалы, помещения, оборудование, подготовку персонала, личную гигиену, методы контроля качества, реактивы и т.д. Таким образом, процесс производства ЛС на каждом его этапе сопровождается контролем качества исходного сырья, упаковочных, вспомогательных и других материалов, полупродуктов и конечного продукта.

Контроль качества является неотъемлемой частью производственного процесса, должен иметь предупредительный характер и не допускать появления на фармацевтическом рынке неэффективных и небезопасных ЛС, которые представляют серьезную угрозу здоровью и жизни человека. В структуре каждого фармацевтического предприятия работает отдел контроля качества (ОКК), который осуществляет **внутренний контроль**, в том числе, и постоянный микробиологический контроль (мониторинг). **Микробиологический мониторинг** проводится постадийно в соответствии с принципами GMP и действующими отраслевыми документами. В ходе постадийного контроля проверяется:

- соответствие используемых сырья, вспомогательных, упаковочных, маркировочных материалов и полупродуктов требованиям нормативной документации;
- санитарное состояние цехов, рабочих мест, оборудования, рук и одежды персонала;
- выполнение регламентированных технологических операций и соблюдение технологических режимов работы (напр., оценка эффективности дезинфекции, стерилизации).

2. Микробиологический контроль в аптечных учреждениях

Внешний **(государственный**) микробиологический контроль производства ЛФ в аптечных учреждениях проводится на основании требований Методических указаний по микробиологическому контролю в аптеках от 1984 г. (МУ 3182-84) не реже 2 раз в квартал микробиологической лабораторией Центра контроля качества и сертификации ЛС при территориальном Управлении Росздравнадзора (ведомственная служба) и микробиологической лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии при территориальном Управлении Роспотребнадзора (вневедомственная служба).

Цели проведения санитарно-микробиологического исследования:

1) контроль общего гигиенического состояния и качества промежуточной и готовой продукции (текущий надзор);
2) выявление фекального загрязнения (микробиологический контроль санитарно-гигиенического режима на предприятии);
3) выявление контаминации ЛП и объектов окружающей среды патогенными микроорганизмами, как возможных факторов при передаче возбудителей инфекционных заболеваний (обследование по показаниям).

Объекты микробиологического контроля в аптеках:

1) факторы технологического процесса:
- исходное сырье, вспомогательные вещества и материалы,
- воздушная среда,
- вода очищенная и вода для инъекций,
- рабочие поверхности помещений и оборудования,
- руки и санитарная одежда персонала,

2) промежуточная продукция и готовые лекарственные средства.

Провизоры, занятые изготовлением лекарственных препаратов, являются источником микробного загрязнения ЛФ. Наиболее часто инфицируются открытие участки тела, главным образом руки. Микрофлора рук человека зависит от санитарно-гигиенических условий труда и быта, питания и др. факторов. На коже могут присутствовать и патогенные микробы, которые обусловливают контактный способ передачи желудочно-кишечных и гнойничковых заболеваний, грибковых поражений кожи.

Объем микробиологических исследований

Исследования проводятся методом посева смывов с кожи рук.

1. Отсутствие санитарно-показательных микроорганизмов: кишечная палочка, патогенные стафилококки.

3.Изучение биохимических свойств микроорганизмов.

Третий день исследования

Каждый вид микроорганизмов характеризуется определенным типом биохимической активности. Наиболее часто определяются ферменты класса гидролаз и оксизоредуктаз, используя специальные методы и среды.

Изучение биохимических свойств производят на дифференциально-диагностических средах Гисса ("пестрого ряда") и др. "Пестрый ряд" состоит из 6 пробирок: 5 из них используются для изучения сахаролитических свойств, 1 - протеолитических свойств.

Сахаролитические свойства (расщепление углеводов)

В пробирки с мясо-пептонным бульоном добавляют 1% раствор одного из 5 углеводов (название написано на пробирке: сахароза, глюкоза, мальтоза, маннит, лактоза) и индикатор Андреде (фуксин, обесцвеченный в щелочной среде). Цвет среды до посева - желтый (цвет МПБ). В процессе жизнедеятельности микроорганизмы выделяют ферменты, расщепляющие углеводы до кислот и газов (или только до кислот).

- Определение выделившейся кислоты производят по изменению цвета среды с желтого на розовый (красный), т.к. при выделении кислоты pH становится < 7,0 фуксин восстанавливает окраску.
- Для обнаружения газов в пробирку вставляют стеклянные колпачки, запаянные с одного конца (перевернутая пробирочка). До посева колпачок заполнен питательной средой, после посева, если выделяется газ, в колпачке появляется пузырек.

Протеолитические свойства (расщепление белков)

В 6-ю пробирку наливают 1% пептонную воду (МПБ). Белки расщепляются микробными ферментами до газов: индол, скатол, аммиак, сероводород и т.д. В микробиологических лабораториях принято определять индол и сероводород. С этой целью под пробки пробирок после посева вставляют фильтровальные бумажки, смоченные индикаторами на индол и сероводород:

- ***на индол*** – щавелевой кислотой – при наличии газа бумажка окрашивается в ***красный*** цвет,
- ***на сероводород*** - ацетатом свинца – в присутствии газа бумажка окрашивается в ***черный*** цвет.

Лабораторное занятие №11

Тема: ЗАЧЕТ ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Продолжительность занятия: 1 час

Цель занятия: освоить методы учета результатов микробиологической чистоты и стерильности лекарств, идентификацию чистой культуры микроорганизма по совокупности изученных свойств.

Сдать зачет по разделу «**Общая микробиология. Фармацевтическая микробиология»**

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова.- М.: Медицина, 1994. – 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина – 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – С. 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. **Учет результатов санитарно-бактериологического исследования смывов с объектов внешней среды и рук персонала:**

а) учет наличия E.coli: оценить культуральные свойства выросших колоний. Наличие типичных колоний (темно-малинового цвета с металлическим блеском) на среде Эндо свидетельствует о наличии *E. coli* в смыве. Отсутствие характерных колоний свидетельствует об отсутствии *E. coli.*

б) учет наличия *S. aureus:* оценить культуральные свойства выросших колоний. Наличие типичных золотисто-желтых колоний, окруженных перламутровыми зонами помутнения (радужным венчиком) на ЖСА вследствие наличия лецитиназной активности, свидетельствует о росте *S. aureus.* Отсутствие характерных колоний свидетельствует об отсутствии *S. aureus,*

2. а) Учет результатов определения гликолитических и протеолитических (на средах Гисса) свойств выделенной чистой культуры бактерий.

Оснащение:

1) среды Гисса с посевами

Методика

Учет результатов роста на дифференциально-диагностических средах произвести в соответствии с рекомендациями – см. информационный блок к занятию № 10.

Зарисовать результат, данные зафиксировать в протоколе исследования.

б) Сделать заключение о видовой принадлежности чистой культуры бактерий.
Оснащение:
1) протокол исследования по выделению чистой культуры микроорганизма
2) таблица: «Ферментативная активность энтеробактерий»

Методика

По совокупности изученных свойств: морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических (используя дифференциально-диагностическую таблицу), наличия подвижности – сделать заключение о видовой принадлежности чистой культуры микроорганизмов, выделенной при изучении микробиологической чистоты таблеток. Данные внести в протокол исследования.

3. Учет результатов определения микробиологической чистоты таблеток.

Оснащение:
1) чашка с посевом на среду Эндо;
2) чашка с посевом на висмут-сульфитный агар (среда №5).

Методика

Определение наличия E. coli

Наличие типичных колоний (темно-малинового цвета с металлическим блеском) на среде Эндо свидетельствует о наличии *E. coli* в образце.

Определение бактерий рода Salmonella

Наличие типичных колоний (черные колонии с антрацитовым блеском, среда под колониями окрашена в черный цвет)свидетельствует о наличии *бактерий рода Salmonella* в образце.

Сделать заключение по результатам изучения микробиологической чистоты таблеток о соответствии требованиям НД. Данные внести в таблицу.

4. Учет результатов исследования стерильности инъекционного раствора и глазных капель.
Оснащение:
1) 2 пробирки с посевами на тиогликолевую среду;
2) 2 пробирки с посевами на жидкую среду Сабуро.

Методика

Учет результатов производится по наличию или отсутствию роста микробов визуально. О наличии роста судят по появлению мутности, пленки, осадка и других макроскопических изменений. Наличие микроорганизмов подтверждается микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Препарат считается удовлетворяющим требованиям ГФ-12 при сохранении прозрачности среды, что свидетельствует об отсутствии роста микроорганизмов

Данные внести в таблицу (см. занятие №10), сделать заключение о соответствии НД.

Лабораторное занятие №12

***Тема*: УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ**

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: ознакомление с особенностями инфекционных заболеваний, закономерностями инфекционного процесса, факторами инфекционного процесса, формами инфекций, основами эпидемиологии, видами иммунитета, механизмами неспецифической защиты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Определение понятий "инфекция", «инфекционный процесс», «инфекционная болезнь».
2. Особенности инфекционного процесса. Периоды инфекционного процесса.
3. Роль микроба в возникновении заболевания. Патогенность. Понятие об облигатно-патогенных, условно-патогенных, непатогенных микроорганизмах.
4. Вирулентность Факторы вирулентности микроорганизма, единицы вирулентности.
5. Токсины бактерий. Белковые токсины, классификация основные свойства и механизм действия.
6. Роль макроорганизма и внешней среды в развитии инфекции.
7. Виды инфекции. Эпидемиологическое значение носительства патогенных микробов..
8. Формы инфекций (по происхождению, по длительности течения, по степени выраженности симптомов, по характеру локализации, по распространению).
9. Определение понятия «эпидемиология», элементы эпидемиологического процесса.
10. Источники инфекции и пути передачи, характеристика. Входные ворота инфекции.
11. Облигатный внутриклеточный паразитизм вирусов. Патогенетические особенности вирусных инфекций.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1**.** Выписать особенности (признаки) инфекционных заболеваний.
2**.** Выписать основные факторы вирулентности микроорганизмов.
3**.** Перечислить основные отличия экзотоксинов и эндотоксинов.
4. Выписать группы заболеваний в зависимости от источника инфекции
5. Заполнить таблицу «Формы инфекций и интенсивность эпидемиологического процесса»,

Таблица 1

Формы инфекций и интенсивность эпидемиологического процесса

Признак	Наименование форм инфекций	характеристика
1. Природа возбудителя	- бактериальная - вирусная - протозойная - грибковая	
2. Происхождение	- экзогенная - эндогенная (аутоинфекция)	
3. Локализация в организме	- очаговая (местная) - генерализованная: - сепсис	

	- септикопиемия - бактериемия - токсинемия	
4. Число видов возбудителей	- моноинфекция - смешанная (микст) инфекция	
5. Повторное проявление заболевания, вызванное теми же или др. возбудителями	- вторичная - реинфекция - суперинфекция - рецидив	
6. Продолжительность	- острая - хроническая - микробоносительство	
7. Проявление	- манифестная - инаппарантная - бессимптомная	
8. Степень опасности	- конвенционные (карантинные)	
9. Степень интенсивности инфекционного процесса	- спорадические заболевания - эпидемия - пандемия	
10 По распространенности (встречаемости) заболевания	- эндемия - убиквитарные инфекции	

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3 Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. - М.: Медицина, 1994. – с. 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – с. 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. - С. 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Определить микроскопически наличие факторов вирулентности бактерий (демонстрационные мазки):

а) *выявление капсулы у пневмококков* (демонстрация).

Оснащение:

1. микроскоп
2. иммерсионное масло
3. демонстрационные препараты капсульных микроорганизмов (S. pneumoniae)
4. таблица, слайды «Капсулы у бактерий»
5. мультимедийный проектор, ноутбук.

Методика

Промикроскопировать и зарисовать в рабочую тетрадь микроскопическую картину капсульных бактерий при окраске по методу Гинса-Бурри.

б) *выявление корд-фактора микобактерий* (демонстрация).

Оснащение:

1. микроскоп
2. иммерсионное масло
3. демонстрационные препараты микобактерий
4. таблица, слайды «Корд-фактор M. tuberculosis»
5. мультимедийный проектор, ноутбук.

Методика

Промикроскопировать и зарисовать в рабочую тетрадь микроскопическую картину корд-фактора микобактерий.

2. Выявить токсины и ферменты - факторы вирулентности стафилококков:

а) *определение наличия гемолизина*.

Оснащение:

1. спиртовка, спички
2. бактериологическая петля
3. скошенный агар с чистой культурой S. aureus
4. чашка Петри с кровяным агаром
5. термостат

Методика

Сделать посев испытуемой культуры «бляшками» в чашки Петри с кровяным агаром. Чашки поместить в термостат при 37ºС на 24 часа. В случае наличия гемолитической активности (гемолизина) вокруг «бляшек» образуются прозрачные зоны гемолиза.

Зарисовать результат. Сделать заключение.

б) *определение наличия лецитиназы*.

Оснащение:

1. спиртовка, спички
2. бактериологическая петля
3. скошенный агар с чистой культурой S. aureus
4. чашка Петри с агаром с лецитином
5. термостат

Методика

Сделать посев испытуемой культуры «бляшками» в чашки Петри с агаром с лецитином. Чашки поместить в термостат при 37ºС на 24 часа. В случае наличия лецитиназной активности (лицитиназы) вокруг «бляшек» образуются прозрачные зона помутнения с перламутровым блеском.

Зарисовать результат. Сделать заключение

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

Ферменты агрессии и микробные токсины

Ферменты агрессии микроорганизмов способствуют *инвазивности* микробов (от лат. invasum – нападать, вторгаться) - это способность микробов проникать в ткани, находящиеся за пределами входных ворот инфекции. Наиболее часто микробы обладают следующими ферментами: *плазмокоагулаза* (обусловливает свертывание плазмы, образование фибринового сгустка вокруг микробов, что способствует экранированию от иммунокомпетентных клеток), *фибринолизин* (вызывает разрушение фибринового сгустка, способствует продвижению микробов по тканям), *гиалуронидаза* - разрушает гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани, что способствует инвазивности микробов, *коллагеназа* разрушает коллагеновые волокна,

вызывая расплавление тканей, *нейраминидаза* способствует преодолению слоя слизи, отщепляя от различных гликопротеидов, гликолипидов, полисахаридов сиаловую (нейраминовую) кислоту, повышая проницаемость различных тканей, *ДНК-аза* (разрушение структуры ДНК клеток), *липазы* (способствуют разрушению сальных «пробок» в устье волосяных фолликулов), *β-лактамазы* (нарушают структуру β-лактамных антибиотиков), *протеазы,* действие которых в первую очередь направлено на разрушение антител; *лецитовителлаза (*лецитиназа) - разрушает лецитин, входящий в состав оболочек клеток.

Микробные токсины. В зависимости от мишени действия выделяют: *нейротоксины* - поражают клетки нервной ткани, *гемолизины* - вызывают цитолиз, разрушают эритроциты, клетки эндотелия сосудов, тромбоциты, гепатоциты, а также дермонекротический, нейротоксический и кардиотоксический эффекты, *энтеротоксины* - поражают эпителий тонкого кишечника, *дерматонекротоксины* - вызывают некротические поражения кожных покровов, *лейкоцидины* - повреждают фагоциты (лейкоциты).

По механизму действия выделяют цитотоксины (например, энтеротоксины или дерматонекротоксины), мембранотоксины (например, гемолизины и лейкоцидины), функциональные блокаторы (например, холероген), эксфолиатины (вызывают разрушение десмосом зернистого слоя эпидермиса и «листовидную» отслойку рогового слоя) и эритрогенины (обладают цитотоксичным, пирогенным действием, вызывает расширение мелких сосудов), *летальный токсин* вызывает гибель лабораторных животных. Нередко патогенные бактерии синтезируют несколько экзотоксинов, проявляющих различное действие (летальное, гемолитическое, цитотоксическое и т.д.).

Лабораторное занятие №13

Тема: ИММУНИТЕТ. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: изучить механизмы неспецифической и специфической защиты организма, сущность серологического метода диагностики.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Определение понятия "иммунитет". Виды иммунитета, их характеристика.
2. Механизмы защиты организма: неспецифические и специфические, их характеристика.
3. Понятие о механических, физико-химических и биологических барьерах (кожные и слизистые барьеры, нормальная микрофлора, фагоцитоз, механизм, стадии, виды, роль; нормальные киллеры, клеточная ареактивность).
4. Гуморальные факторы неспецифической резистентности: комплемент, лизоцим и др.
5. Виды и свойства антигенов. Антигенное строение микробной клетки.
6. Иммунная система: органы и клетки. Виды иммунного ответа.
7. Антитела, классы, строение, виды фазы антителообразования.
8. Механизмы гуморального и клеточного иммунитета.
9. Иммунопрофилактика, иммунотерапия и иммунокоррекция.
10. Серологический метод диагностики. Реакции иммунитета, определение, компоненты, фазы.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ

1. Перечислить виды антигенов.
2. Выписать физико-химические неспецифические факторы защиты.
3. Перечислить центральные и периферические органы иммунной системы.
4. Перечислить и дать краткую характеристику 5 классов иммуноглобулинов.
5. Заполнить таблицу «Характеристика факторов неспецифической противоинфекционной защиты».

Таблица 1

Характеристика факторов неспецифической противоинфекционной защиты

Клеточные факторы	Механизм действия	Гуморальные факторы	Механизм действия
1. Кожа	а) механический барьер слущивание эпителия, б) бактерицидное действие молочной, жирных кислот, - ферменты потовых и сальных желез.	1. лизоцим	бактерицидное действие: разрушает пептидогликан клеточной стенки бактерий, что приводит к лизису клетки.
2.Слизистые оболочки дыхательных	а) механический барьер б) бактерицидное действие	2. интерфероны	

путей, ЖКТ и др.	лизоцима в) слизь препятствует адгезии бактерий к эпителию г) удаление микроорганизмов за счет движения ресничек, волосков		
3.Нормальная микрофлора		3. комплемент	
4.Лимфоидная ткань		4. β-лизины	
5. Фагоцитоз		5. трансферрин	
6. Естественные киллеры (NK)		6. фибронектин	
7. Клеточная ареактивность		6. Естественные («антигеннезависимые») антитела	

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3 Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. - М.: Медицина, 1994. – с. 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – с. 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. - С. 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Просмотреть и зарисовать стадии фагоцитоза стафилококка (завершенный фагоцитоз) и гонококка (незавершенный фагоцитоз).

Оснащение:

1. демонстрационные препараты завершенного и незавершенного фагоцитоза
2. микроскоп/мультимедийный проектор, ноутбук
3. Таблицы:

«Фагоцитоз стафилококков», «Стадии завершенного фагоцитоза»,

2. Поставить реакцию преципитации по Асколи с шерстью животного с подозрением на сибирскую язву. Сделать заключение.

Оснащение:

1) штатив;
2) пробирка с преципитирующей сывороткой;
3) пробирка с шерстью животного;
4) пробирка с изотоническим раствором хлорида натрия,
5) водяная баня;
6) пипетки на 1 и 2 мл

Методика

а) Приготовление раствора антигена. Шерсть заливают изотоническим раствором хлорида натрия и выдерживают на водяной бане 15-20 мин., после чего фильтруют и охлаждают.

б) В пробирку наливают неразведенную преципитирующую противосибириязвенную сыворотку в количестве 0,5-1,0 мл. Антиген наслаивают пипеткой осторожно по стенкам (пробирка в наклонном положении). Пробирку осторожно ставят вертикально.

Учет результатов через 5-10 мин. При положительной реакции на границе между сывороткой и исследуемым материалом появляется преципитат в виде белого кольца. Т. е. шерсть исследуемого животного содержит сибиреязвенный антиген.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Клеточные факторы неспецифической защиты
2. Понятие об иммунном статусе человека
3. Иммунодефицитные состояния человека
4. Иммунопрофилактика, иммунокоррекция, иммунотерапия

1. Клеточные факторы неспецифической защиты

Клеточное звено НФЗ включает мононуклеарные фагоциты (моноциты, тканевые макрофаги), гранулоциты — нейтрофилы, эозинофилы, базофилы (микрофаги), а также киллерные клетки — естественные (ЕК-клетки),

Мононуклеарные фагоциты выполняют в организме двоякую функцию: они участвуют в непосредственной защите организма от чужеродных веществ за счет фагоцитоза и антителозависимого киллинга («клетки-мусорщики», «клетки тревоги»). С другой стороны, моноциты и макрофаги способны взаимодействовать с лимфоидными клетками, “включая” и регулируя механизмы специфического иммунитета («клетки-диспетчеры»). Эту функцию они выполняют за счет способности презентировать (представлять) чужеродный антигенный материал для распознавания Т-лимфоцитам и продуцировать цитокины.

Моноциты периферической крови и тканевые макрофаги происходят из полипотентной стволовой клетки. Попав в кровяное русло, моноциты в течение суток расселяются в ткани, где они превращаются в тканевые макрофаги. Т.е. тканевые макрофаги - производные моноцитов. К ним относят: плевральные и перитонеальные макрофаги, купферовские клетки печени, альвеолярные макрофаги, макрофаги вилочковой железы (тимические), остеокласты, глиальные макрофаги мозга, дендритные клетки лимфатических узлов и селезенки, клетки Лангерганса кожи и слизистых оболочек и др.

Подсчитано, что суточная порция моноцитов, покидающих кровяное русло, в тканях распределяется следующим образом: 56,4% - печень; 14,9 - легкие; 7,6 - брюшная полость; 21,1% - другие ткани. Длительность жизни тканевых макрофагов от 40 до 60 суток.

Особенностью тканевых макрофагов является наличие гранул - лизосом, в которых содержатся различные ферменты: гидролазы, фосфатаза, липаза, лизоцим, коллагеназа и др.

Одной из основных функций тканевых макрофагов является фагоцитоз - процесс поглощения чужеродного материала, его разрушение и выведение из организма. Клетками, ответственными за эту функцию, являются моноциты и нейтрофилы.

Процесс завершенного фагоцитоза включает несколько этапов: 1) хемотаксис, т. е. ее продвижение по направлению к объекту, который вызвал ее активацию; 2) прикрепление к данному объекту (адгезия); 3) собственно заглатывание этого объекта; 4) переваривание, или процессинг, поглощенного объекта. При отсутствии последнего этапа фагоцитоз нарушается и носит название незавершенного. При этом фагоцитированные микроорганизмы выживают и могут длительно оставаться во вторичных лизосомах. Многие факультативные и облигатные внутриклеточные паразиты не только сохраняют жизнеспособность внутри клеток, но и способны размножаться, т.е. **персистировать** в организме. Персистирование патогенов опосредуют три основных механизма:

• *Блокада фагосомо-лизосомального слияния*. Этот феномен обнаружен у вирусов (например, у вируса гриппа), бактерий (например, у микобактерий) и простейших (например, у токсоплазм).

• *Резистентность к лизосомальным ферментам* (например, гонококки и стафилококки).

• *Способность патогенных микроорганизмов* быстро покидать фагосомы после поглощения и длительно пребывать в цитоплазме (например, риккетсии).

Процесс фагоцитоза значительно усиливается при опсонизации антигена - адсорбции на поверхности антигенов опсонинов, которые стимулирует и облегчает фагоцитоз (рис.1). К опсонинам относят комплемент, иммуноглобулины, фибронектин - гликопротеин, который связывается с микроорганизмами, и к которому на поверхности нейтрофилов и макрофагов имеется рецептор, за счет чего происходит связывание микроорганизмов, обработанных фибронектином.

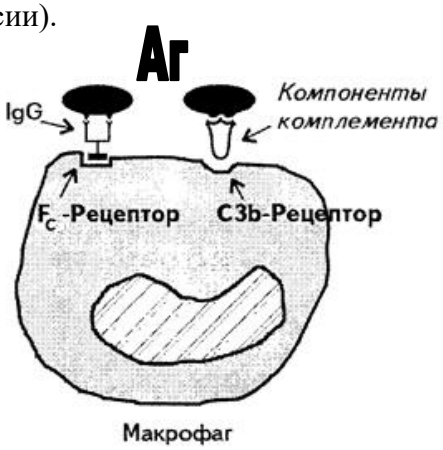


Рис.1. Фагоцитоз опсонированных антигенов

Наряду с моноцитами и тканевыми макрофагами, в реализации клеточных реакций врожденного иммунитета принимают участие гранулоциты.

Гранулоциты - это полиморфноядерные лейкоциты, циркулирующие в крови. Различают три типа гранулоцитов - нейтрофильные, эозинофильные и базофильные.

Нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) составляют наибольшую часть популяции полиморфноядерных лейкоцитов. Основные функции нейтрофилов - хемотаксис, фагоцитоз и секреция.

Эозинофильные гранулоциты (эозинофилы) помогают организму избавиться от крупных паразитов типа гельминтов, которые физически не могут быть фагоцитированы.

Базофилы имеют меньшее значение в процессе фагоцитоза. Они выделяют гепарин, серотонин и гистамин, которыми и обусловлены функции базофилов в воспалительном процессе.

Еще одну группу клеточных факторов составляют киллерные клетки. Особенностью ЕК-клеток является способность лизировать клетки-мишени без предварительной сенсибилизации, что отличает их от цитотоксических Т-лимфоцитов-киллеров. Морфологически естественные киллерные клетки большого размера, с зернистостью и низкой плотностью, на основании чего их относят к большим гранулярным лимфоцитам (БГЛ). Клетками-мишенями для ЕК-клеток являются практически все ядросодержащие клетки, однако наибольшую активность ЕК-клетки проявляют по отношению к опухолевым и пораженным вирусом клеткам.

2. Понятие об иммунном статусе человека

Иммунный статус - совокупность специфических и неспецифических показателей иммунитета. Эти показатели могут быть измерены и выражены количественно.
Показатели специфического звена иммунной системы:
- уровень Ig всех классов
- кол-во и активность Т и В лимфоцитов и их субпопуляций
- выраженность клеточного и гуморального иммунитета
- состояние системы иммуноцитокинов
- активность иммунного фагоцитоза и др.
Показатели естественной резистентности:
- содержание макрофагов и их фагоцитарной активности
- функционирование NK
- содержание комплемента, интерферона, лизоцима и др.
В период новорожденности иммунная система ребенка подавлена. Иммунитет имеет пассивный характер и обеспечивается материнскими антителами. Новорожденный проявляет слабую резистентность к различным возбудителям. Очень высока чувствительность ребенка к вирусным инфекциям. К 5-6 годам средняя концентрация IgG и IgM в крови соответствует уровню взрослых, однако уровень IgA в крови еще не достигает окончательных значений. В подростковом периоде окончательно формируется тип иммунного ответа. После начала полового созревания подвергается значительной атрофии и инволюции тимус. Дополнительное уменьшение размеров тимуса происходит при старении организма, с чем отчасти связывают понижение иммунитета у пожилых людей, повышается восприимчивость к инфекционным агентам.
Иммунный статус находится в динамическом равновесии, т.к. на него действуют климатические (температура, влажность), социально-биологические (питание, условия труда и быта), экологические (близость крупных промышленных объектов) и эндогенные факторы (хронические, в т.ч. инфекционные заболевания, нарушение гормонального фона). Под влиянием инфекции, излучения, химических веществ, лекарств и др., а также в результате врожденных генетических дефектов иммунный статус может нарушаться. Эти изменения изучает клиническая иммунология.

3. Иммунодефицитные состояния

Иммунодефициты - нарушение иммунного статуса и способности к нормальному иммунному ответу. Эти нарушения обусловлены дефектами одного или нескольких звеньев иммунной системы.
Классификация иммунодефицитов:
I. по происхождению:
1. Врожденные

первичные
это дефекты фагоцитов, системы комплемента, В-лимфоцитов и др. инфекций (краснухи, ЦМВИ),

следствия лимфопролиферативных заболеваний.

вторичные
гормональные дисфункции,
последствия внутриутробных

дефекты Т и В - звеньев как

2. Приобретенные

первичные
(СПИД, лимфогранулематоз, приобретенные дефекты фагоцитов)

вторичные
дефекты, связанные с инфекциями и интоксикациями, метаболическими нарушениями

(диабет, истощение и др.), дефекты, вызванные лечебными воздействиями (облучение, хирургическое вмешательство и др.)

II. по уровню дефекта иммунной системы:
- дефекты Т-системы,
- дефекты В-системы,
- комбинированные дефекты Т и В систем.

III. по причинам возникновения:
1) размножение возбудителей в клетках иммунной системы (вирусы, риккетсии, грибы, простейшие, бактерии). Например, ВИЧ – размножается в Т-лимфоцитах, вирус Эпштейна – Барр - в В-лимфоцитах.

2) дефекты метаболизма (диабет, атеросклероз и др.).
3) иммунопролиферативные заболевания.
4) использование иммунодепрессантов и др.

Для лабораторной диагностики иммунодефицитного состояния производится *оценка иммунного статуса.*
1. Ориентировочный клинический этап - оценка иммунобиологического анализа (частота инфекционных заболеваний, хронические инфекции и др.)

Клинический анализ крови (содержание форменных элементов, микробоносительство).
2. Иммунобиологические тесты I и II уровней.

Определяется процентное содержание и абсолютное количество Т и В-лимфоцитов:
К тестам I уровня относится определение концентрации Ig M, Ig G, Ig A (иммунодиффузия), уровень неспецифической защиты оценивают при определении фагоцитарной активности нейтрофилов крови.
Тесты II уровня:
1) определение субпопуляций Т-лимфоцитов,
2) оценка активности субпопуляций и др.

4. Иммунопрофилактика, иммунотерапия

Иммунопрофилактика - использование иммунобиологических препаратов с профилактической целью, введение протективных антигенов, создающих активный искусственный иммунитет (вакцины).
Иммунотерапия - использование иммунологических препаратов с лечебной целью, введение готовых антител, создающих пассивный иммунитет (антитоксические сыворотки, Ig, применяемые для лечения дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, стафилококковых инфекций).
Предпринимаются попытки иммунотерапии опухолей с помощью введения противоопухолевых моноклональных антител. Другим примером иммунотерапии является многократная десенсибилизирующая иммунизация больных аллергией тем аллергеном, который является причиной болезни. К разряду иммунотерапевтических относятся операции по удалению иммунных комплексов путем гемосорбции или плазмофереза при аутоиммунных заболеваниях и др.

Лабораторное занятие №14

Тема: АЛЛЕРГИЯ. ВИДЫ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, МЕХАНИЗМЫ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ АЛЛЕРГИИ

Продолжительность занятия: 3 часа.

Цель занятия: изучить основные типы аллергических реакций и клинические проявления; методологию проведения аллергологических проб; освоить методы учета результатов аллергопроб (на примере реакции Манту).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ

1. Аллергия. Условия, необходимые для возникновения аллергии.
2. Аллергены, свойства и виды.
3. Основные виды аллергических реакций
4. РГНТ, механизм, клинические проявления.
5. РГЗТ, механизм, клинические проявления.
6. Основные направления диагностики аллергии.
7. Основные направления лечения и профилактики аллергии.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ:

1) выписать варианты клинического проявления РГНТ.
2) выписать варианты клинического проявления РГЗТ.
3) Перечислить и дать краткую характеристику аллергенов.
4) Перечислить и дать краткую характеристику фаз течения РГНТ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М.- М.: Медицина, 1994. 288 с.
4. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Изучить методики постановки аллергических проб по демонстрационным слайдам. Записать характеристику методов в рабочую тетрадь.

Оснащение:

1) слайды с методиками постановки аллергопроб при инфекционной и неинфекционной аллергии
2) мультимедийный проектор
3) ноутбук

2. Описать схему выявления инфекционной аллергии на примере постановки реакции Манту.

Методика

Учет результатов постановки реакции Манту:

- отрицательной проба считается, если отсутствует папула или есть уколочная реакция 0-1 мм.

-сомнительной проба считается при размере инфильтрата 2-4 мм и при гиперемии (увеличение кровенаполнения ткани, покраснение) любого размера.

- положительной проба считается при наличии инфильтрата от 5 до 16 мм.

- гиперергическая реакция фиксируется при диаметре инфильтрата 17 мм и больше или пузырьке, некрозе любого размера.

3. Ознакомиться с препаратами, используемыми для лечения аллергических заболеваний.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

Аллергия – измененная реактивность организма в ответ на введение генетически чужеродных веществ.

Аллерген – генетически чужеродное биологическому виду вещество. Преимущественно, в качестве аллергенов для человека, выступают – патогенные микроорганизмы, их токсины, лекарственные препараты.

Иммуноглобулины Е – IgE (0,002% от общего числа иммуноглобулинов) фиксируются на поверхности тучных клеток. Играют основную роль в механизме развития РГНТ.

Классификация по Джеллу и Кумбсу:

Тип реакции	Фактор патогенеза	Механизм патогенеза	Клинический пример
анафилактический (РГНТ)	IgE IgG4	Образование рецепторного комплекса IgE (G4)-АсК тучных клеток и базофилов → Взаимодействие эпитопа аллергена с рецепторным комплексом → Активация тучных клеток и базофилов → Высвобождение медиаторов воспаления и других биологически активных веществ	Анафилаксия, анафилактический шок, поллинозы
цитотоксический (РГНТ)	IgM IgG	Выработка цитотоксических антител → Активация антителозависимого цитолиза	Лекарственная волчанка, аутоиммунная гемолитическая болезнь, аутоиммунная тромбоцитопения
иммунокомплексный (РГНТ)	IgM IgG	Образование избытка иммунных комплексов → Отложение иммунных комплексов на базальных мембранах, эндотелии и в соединительнотканной строме → Активация антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности → Запуск иммунного воспаления	Сывороточная болезнь, системные заболевания соединительной ткани
клеточно-	Т-	Сенсибилизация Т-	Контактная аллергия

опосредованный (РГЗТ)	лимфоциты	лимфоцитов → Активация макрофага → Запуск иммунного воспаления	

Лабораторное занятие №15

***Тема*: ВАКЦИНЫ. ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ, ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ**

Продолжительность занятия: 3 часа

Цель занятия: познакомиться с понятием, видами, методами получения и контроля вакцинных препаратов, иммунных сывороток и иммуноглобулинов; освоить методику изучения состава ассоциированных вакцин.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ:

1. Определение понятий вакцины, вакцинопрофилактика, вакцинотерапия.
2. Виды вакцин, цель применения. Определение, характеристика, методы получения, контроль при производстве.
3. Понятия серопрофилактики и серотерапии инфекционных заболеваний. Методы введения вакцин.
4. Условия хранения иммунобиологических препаратов, контроль при отпуске.
5. Иммунные сыворотки, понятие. Виды иммунных сывороток по назначению, цель применения. Виды лечебно-профилактических сывороток.
6. Принцип получения антитоксических и антимикробных сывороток. Методы очистки иммунных сывороток. Контроль лечебно-профилактических иммунных сывороток.
7. Пути введения иммунных сывороток. Осложнения серотерапии, способы их предупреждения.
8. Диагностические препараты: диагностикум, диагностические сыворотки, бактериофаги.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА НА ЗАНЯТИИ:

1. Перечислить инфекционные заболевания, вакцинопрофилактика которых входит в календарь профилактических прививок в РФ
2. Перечислить виды ассоциированных вакцин, привести примеры (не менее 10) с указанием инфекционных заболеваний, для профилактики которых они используются.
3. Перечислить антитоксические сыворотки, используемые в серотерапии
4. Перечислить виды иммуноглобулинов, применяемых в медицине (с примерами).
5. Выписать группы диагностических иммунобиологических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М.- М.: Медицина, 1994. – 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – 352 с.

6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ ОСНОВА ДЕЙСТВИЯ СТУДЕНТОВ К ВЫПОЛНЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЫ

1. Изучить состав ассоциированных вакцин «АКДС», «Инфанрикс», «Пентаксим».

Методика

Изучить состав ассоциированных вакцин «АКДС», «Инфанрикс», «Пентаксим» по информации, указанной в инструкции, заполнить таблицу «Компоненты ассоциированных вакцин» в рабочей тетради.

Оснащение:

1. Упаковки вакцин «АКДС», «Инфанрикс», «Пентаксим»
2. Инструкции по использованию вакцин «АКДС», «Инфанрикс», «Пентаксим»

Компоненты ассоциированных вакцин

Название вакцины	Протективный антиген	Тип формируемого иммунитета	Консервант	Стабилизатор	Адъювант
АКДС	1) 2) 3)				
Инфанрикс	1) 2) 3) 4) 5)				
Пентаксим	1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8)				

2. Изучить демонстрационные препараты, ознакомиться с рекомендациями по применению вакцин, иммунных сывороток, иммуноглобулинов, диагностических препаратов.

Оснащение:

1. Набор демонстрационных вакцин, лечебно-профилактических сывороток, иммуноглобулинов, диагностических препаратов.
2. Набор рекомендаций по применению медицинских иммунобиологических препаратов

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

1. Предпосылки эффективной вакцинации.

2. Иммунобиологические препараты, применяемые с диагностической целью.

1. Предпосылки эффективной вакцинации

1. Характер иммунитета в естественных условиях. Ожидать высокую эффективность вакцинации следует при острых инфекциях, протекающих циклически и быстро заканчивающихся выздоровлением в связи с выработкой иммунитета (натуральная оспа, туляремия, полиомиелит и др.). Значительно менее эффективна вакцинация при затяжных инфекциях, при которых иммунитет формируется длительно (малярия, бруцеллез). При хронических инфекциях (трахома, сифилис, проказа) эффективный иммунологический ответ не запрограммирован, и поэтому вакцинация бесперспективна. Бесперспективны и работы по конструированию вакцин при прионных инфекциях, ВИЧ-инфекциях. При туберкулезе, занимающему промежуточное место между острыми и хроническими инфекциями, вакцинация способствует снижению заболеваемости, но не в состоянии радикально решить проблему.

2. *Длительность естественного иммунитета.* При инфекциях, оставляющих длительный или пожизненный иммунитет после естественной встречи с возбудителем можно ожидать эффект от вакцинации (корь, полимиелит и др.), тогда как при инфекциях с кратковременным иммунитетом (1-2 года при гриппе А) не стоит полагаться на вакцинацию, как ведущую меру.

3. *Антигенная стабильность возбудителя*. При натуральной оспе, кори, туляремии этиологический агент обладает выраженной антигенной стабильностью, и с этих позиций вакцинация оправдана.

4. *Степень патогенности возбудителя для человека*. Иммунизация теоретически не обоснованна и мало эффективна при заболеваниях, вызываемых условно-патогенными агентами, когда генетически не запрограммирован сильный иммунный ответ. Так, не ожидаема высокая эффективность при стафилококковой, клебсиеллезной, протейной, синегнойной инфекциях.

5. Вакцинация эффективна при антропонозах с легко свершающимся аэрозольным механизмом передачи. При инфекциях, передающихся трансмиссивным механизмом (желтая лихорадка), природно-очаговых инфекциях с множественными механизмами передачи (клещевой энцефалит) вакцинация дает ограниченный эффект. При сапронозах, возбудители которых сохраняются как биологические виды за счет абиотических факторов окружающей среды, при некоторых из них (столбняк, газовая гангрена) вакцинация обеспечивает высокую степень защиты, не влияя на массив резервуара в природе.

Эффективность использования вакцины складывается из показателей иммуногенности (способности вызывать адекватный иммунный ответ в виде образования протективных антител и Т-лимфоцитов) и реактогенности (способности оказывать побочное действие). Наиболее эффективна вакцина, обладающая высокой иммуногенностью и низкой реактогенностью.

2. Иммунобиологические препараты, применяемые с диагностической целью

1. Диагностические иммунные сыворотки
2. Диагностикумы
3. Комплемент
4. Аллергены
5. Бактериофаги

1. Диагностические иммунные сыворотки содержат известные антитела, используются для определения неизвестных антигенов. К ним относятся:

- агглютинирующая
- преципитирующая
- гемолитическая сыворотки

- Агглютинирующая сыворотка содержит антитела агглютинины, которые склеивают корпускулярные антигены (микробные и другие клетки). *Применяется* при диагностике брюшного тифа (реакция Видаля), дизентерии, холеры, бруцеллеза (реакция Райта) и др.
- Преципитирующая сыворотка содержит антитела преципитины, которые осаждают растворимые антигены (микробные белки, экстракты из пищевых продуктов и т. д.).

Применяется при диагностике сибирской язвы (реакция Асколи), чумы, туляремии, судебной медицине, санитарной практике, легкой и пищевой промышленности.

- Гемолитическая сыворотка содержит антитела гемолизины, растворяющие эритроциты. Используется в реакциях лизиса (РСК), входит в состав гемосистемы. Применяется при диагностике гонореи (реакция Борде-Жангу), сифилиса (реакция Вассермана), сыпного тифа, многих вирусных заболеваний, токсоплазмоза, туберкулеза и др.

2. Диагностикумы – известные антигены, убитые микроорганизмы определенного вида. Иногда используются диагностикумы из отдельных антигенов (О-, Н-, V-) микробной клетки. *Используются* в диагностике для определения неизвестных антител в серологических реакциях.

3. Комплемент содержатся в любой свежей сыворотке, обычно используют сыворотку морской свинки, у которой берут кровь из сердца накануне опыта (у 3-4 свинок). Используют и лиофилизированный препарат.

Комплемент *применяют* в РСК (и других реакциях лизиса) в качестве неспецифического компонента.

Эти три препарата используют при серологическом методе диагностики.

4.Аллергены условно делят на *инфекционные* (бактериальные и грибковые) и *неинфекционные* (бытовые, пищевые, эпидермальные, пыльцевые и др.)

Инфекционные аллергены - это убитые микробы (неочищенные аллергены) или экстракты из соответствующих микроорганизмов (очищенные). Выпускают в ампулах в жидком и лиофилизированнном виде.

Инфекционные аллергены используются для выявления инфекционной аллергии (при бруцеллезе, токсоплазмозе, туберкулезе и др.) – повышенной чувствительности к патогенным микробам или иммунологической перестройки в результате вакцинации.

Название аллергенов происходит от наименования инфекционного заболевания (бруцеллин, токсоплазмин, туберкулин и др.).

Аллергологическая диагностика осуществляется с помощью постановки внутрикожных или накожных аллергических проб в сгибательную поверхность предплечья (реакция Манту – при туберкулезе, Бюрне – при бруцеллезе и т. д.). При наличии микробов в организме развивается воспаление, гиперемия, инфильтрация по типу ГЗТ. При отсутствии возбудителя в организме воспаления и других явлений нет.

5. Бактериофаг. Фагодиагностика основана на свойстве строгой специфичности фагов. Она используется для внутривидовой идентификации бактерий. С целью диагностики выделяют чистую культуру возбудителей и используют принцип совместного культивирования выделенного микроба и соответствующего фага. Положительная реакция – наличие хорошо выраженного лизиса. В настоящее время разработана фагодиагностика бактерий р. *Salmonella, Vibrio, Staphylococcus* и др.

Лабораторное занятие №16

***Тема*: ЗАЧЕТ ПО РАЗДЕЛУ ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ»**

Продолжительность занятия: 1 час

Цель занятия: Сдать зачет по разделу «**Основы учения об инфекции и иммунитете».**

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 с.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В. И. Покровского. - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. – 768 с.
3. Микробиология: Учебник /Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., А.М. Рыбакова.- М.: Медицина, 1994. – 288 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина – 1988. – 208 с.
5. Фармацевтическая микробиология/ В. А. Галынкин, Н. А. Заикина, В. И. Кочеровец, Т.С. Потехина. – М.: Арнебия, 2003. – С. 352 с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

СПИСОК ОСНОВНОЙ И ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Микробиология: Учебник для фармацевтических вузов / Олешко Г.И., Одегова Т.Ф., Новикова В.В. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА, 2009. – 377 С.
2. Воробьев, А. А. Микробиология /А. А. Воробьев, А. С. Быков, Е. П. Пашков, А. М. Рыбакова – М: Медицина, 1994. – 288 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: учебное пособие/ под ред. Н.П. Елинова. - М.: Медицина , 1988. – 208 с.
4. Галынкин В. А. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, Н.А. Заикина, В. И. Кочеровец – М.: Арнебия, 2003. – С. 228-231.
5. Медицинская микробиология / Гл. ред. В. И. Покровский, О. К. Поздеев - М.: ГОЭТАР МЕДИЦИНА, 2001. - 768с.
6. Новикова В.В., Бобылева А.А., Рябова О.В. Рабочая тетрадь для выполнения самостоятельных работ и лабораторного практикума по дисциплине «Основы микробиологии и иммунологии» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 Фармация. – Пермь, 2017. – 72 с.

Дополнительная литература

7. Блинов Н. П., Заикина Н. А., Соколова Н. Н. — «Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии», М.: Медицина, 1988.
8. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология/ Л.Б. Борисов. – М.: «МИА», 2002. – 734 с.
9. Воробьев, А. А.— Основы медицинской биотехнологии / А. А. Воробьев. - М.: Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, 1990.
10. Государственная Фармакопея РФ. Т.1. – 13-е изд., доп. – М., 2015, раздел «Методы биологического анализа»// http://femb.ru
11. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках/ Н. С. Егоров. - 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 512 с.
12. Инфекционные болезни с основами эпидемиологии: Учебное пособие / В.М. Баран, А.А. Ключарева, И.А. Карпов, А.М. Хамицкая. Университецкое. – Мн.: 1998. – 285 с.
13. Костинов М.П. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний/М.П. Костинов, Э.Б. Гурвич –М.: Медицина для всех, 2002. – 152с.
14. Кржечковская В.В. Лекарственные средства и иммунная система. Вакцины/ В.В. Кржечковская. – Ростов н/Д: Феникс, 2006. – 285 с.
15. Медицинская и санитарная микробиология: Учеб пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений. / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Широбоков. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
16. Методическое пособие по микробиологическому контролю за соблюдением санитарно-эпидемического режима и качества лекарств в аптеках. Пермь. 1996.
17. Методические указания «Организация и контроль производства лекарственных средств. Стерильные лекарственные средства», 1993
18. Методические указания по микробиологическому контролю в аптеках. М., 1984.
19. Покровский В. И., Пан С. Г., Данилкин Б. К. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник.— М., ГЭОТАР Медицина, 2000.— с. 384, ув. ил.
20. Приказ МЗ РФ №309 от 21.10.97. «Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных организаций».
21. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N 916 "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики"
22. РЛС Энциклопедия лекарств – М., 2006. – 1440 с.
23. Руководство по инфекционным болезням. Под ред. Васильева.// 2003.
24. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды/ А. Сассон. - М.: Мир, 1987. – 411 с.
25. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. - Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464