

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДЛЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ
З МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

Частина VI

Київ - 2020 рік

Зміст

Практичне заняття	ТЕМА	Сторінка
№41	Санітарна мікробіологія	3
№42	Санітарна вірусологія	10
№43	Нормальна мікрофлора ротової порожнини. Роль бактерій, грибів, найпростіших в патології ротової порожнини (1 заняття)	16
№44	Нормальна мікрофлора ротової порожнини. Роль бактерій, грибів, найпростіших в патології ротової порожнини (2 заняття)	23
№45	Патогенетичні закономірності бактеріальних і вірусних інфекцій з переважним ураженням центральної нервової системи та їх лабораторна діагностика	29
№46	Санітарна мікробіологія. Санітарно-мікробіологічні дослідження в аптеках	36
№47	Мікробіологічні дослідження стерильних і нестерильних лікарських засобів	42
	Рекомендована література	48

Практичне заняття №41

Тема: «Санітарна мікробіологія»

Актуальність теми.

Мікроби повсюдно поширені в природі, яка нас оточує. Вони містяться в ґрунті, воді, повітрі, на рослинах, тваринах, харчових продуктах, предметах, в організмі людини і на поверхні її тіла. Складні взаємовідносини мікроорганізмів з середовищем, яке обумовлює їх розмноження, розвиток та виживання, вивчає спеціальна біологічна наука – екологія.

Медична мікробіологія – вивчає патогенні мікроби в тісному зв'язку їх з зовнішнім середовищем. Вона встановлює взаємовідношення між різними видами мікробів, виявляє патогенез, шляхи передачі заразних хвороб і розробляє методи знешкодження заразного матеріалу.

Санітарна мікробіологія – розділ медичної мікробіології, яка вивчає мікроорганізми, які знаходяться в оточуючому середовищі і здатні проявляти негативний вплив на стан здоров'я людини. Вона розробляє мікробіологічні показники гігієнічного нормування, методи контролю за ефективністю знезаражування об'єктів оточуючого середовища, виявляє в об'єктах зовнішнього середовища патогенні, умовно-патогенні та санітарно-показові мікроорганізми.

Лікар будь-якого профілю повинен знати, як правильно брати досліджуваний матеріал, доставити його до лабораторії, провести мікробіологічне дослідження, вірно оцінювати його результати.

Конкретні цілі:

- Тракувати поняття “санітарно-показові мікроорганізми та роль їх як індикатора при оцінці ступеня контамінації патогенними мікроорганізмами об'єктів зовнішнього середовища, води, ґрунту та повітря.
- Аналізувати якісний та кількісний склад мікробів води, ґрунту, повітря і робити висновки про їх безпечність в епідемічному відношенні.
- Інтерпретувати санітарно - бактеріологічні критерії оцінки водних об'єктів, ґрунту та повітря закритих приміщень.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція).

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
Анатомія людини	Аналізувати інформацію про будову тіла людини, системи, що його складають, органи і тканини
Гістологія, цитологія, ембріологія	Інтерпретувати мікроскопічну та субмікроскопічну структуру клітини
Медична і біологічна фізика	Тракувати загальні фізичні та біофізичні закономірності, що лежать в основі біологічних процесів
Медична біологія	Пояснювати на молекулярно-біологічному та клітинному рівні закономірності біологічних процесів

Медична хімія	Трактувати загальні фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі процесів розвитку клітин
---------------	--

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття.

Термін	Визначення
Санітарна мікробіологія	Наука, яка вивчає мікрофлору навколишнього середовища (в тому числі патогенні бактерії та віруси) та процеси, які вони викликають, що може безпосередньо або побічно впливати на здоров'я людини, чи оточуюче середовище.
Задачі санітарної мікробіології	1. Розробка, удосконалення, оцінка мікробіологічних методів дослідження об'єктів навколишнього середовища – води, повітря, ґрунту. 2. Оцінка шляхів впливу людини і тварин на навколишнє середовище. 3. Розробка ГОСТів та інших нормативів, методичних вказівок. 4. Розробка рекомендацій та заходів по оздоровленню об'єктів навколишнього середовища та контроль за їх виконанням. 5. Охорона зовнішнього середовища.
Санітарно-показові (індикаторними) мікроорганізми	Умовно-патогенні мікроби – представники нормальної мікрофлори людини та тварин, виявлення яких в об'єктах зовнішнього середовища свідчить про фекальне або повітряно-крапельне забруднення їх виділеннями людини чи теплокровних тварин.
Вимоги до санітарно-показових мікроорганізмів	1. Вони повинні постійно знаходитися в виділеннях людини та теплокровних тварин і поступати в навколишнє середовище в великій кількості. 2. Вони не повинні мати іншого природного резервуару крім організму людини чи тварин. 3. Після потрапляння в навколишнє середовище, вони повинні зберігати життєздатність протягом строків близьких до строків виживання патогенних мікробів, виводимих із організму тими же шляхами. 4. Вони не повинні розмножуватись у навколишньому середовищі. 5. Вони не повинні змінювати свої біологічні властивості в об'єктах зовнішнього середовища. 6. Вони повинні бути достатньо типові, щоб їх диференціальна діагностика здійснювалась без особливих труднощів. 7. Індикація, ідентифікація та кількісний облік повинні проводитися сучасними, простими, доступними мікробіологічними методами.

Бактерії групи кишкових паличок (БГКП)	Грам негативні, що не утворюють спор палички, які зброджують глюкозу з утворенням кислоти та газу при $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин і в яких відсутня оксидазна активність.
Загальне мікробне число води	Кількість мезофільних, мезотрофних аеробів і факультативних анаеробів, які виростають на МПА при 37°C протягом 24 год.
Колі-індекс	Кількість кишкових паличок в 1 л води
Мікробне число повітря	Кількість мікроорганізмів в 1 м^3 повітря

Теоретичні питання до заняття:

- Значення санітарної мікробіології в діяльності лікаря.
- Завдання і методи проведення санітарно-мікробіологічних досліджень.
- Санітарно-показові мікроорганізми води, повітря, ґрунту.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води. Визначення мікробного числа. Визначення колі-індексу (методом мембранних фільтрів і бродильним).
- Роль води в передачі збудників інфекційних захворювань.
- Методи визначення мікробного числа повітря.
- Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря (седиментаційний та аспіраційний).
- Роль повітря в передачі інфекційних хвороб.
- Патогенні мікроорганізми, які визначають в ґрунті.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту.
- Мікробне число, колі-титр, титр перфрінгенс ґрунту.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Вивчити схеми санітарно-бактеріологічного дослідження води, повітря, ґрунту.
- Здійснити облік результатів визначення колі-індексу і колі-титру води методом мембранних фільтрів.
- Здійснити облік результатів визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів повітря.
- Вивчити апаратуру і поживні середовища, які використовують при санітарно-бактеріологічних і санітарно-вірусологічних дослідженнях об'єктів навколишнього середовища.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають схеми санітарно-бактеріологічного дослідження води, повітря, ґрунту. Здійснюють облік результатів визначення колі-індексу води методом мембранних фільтрів.

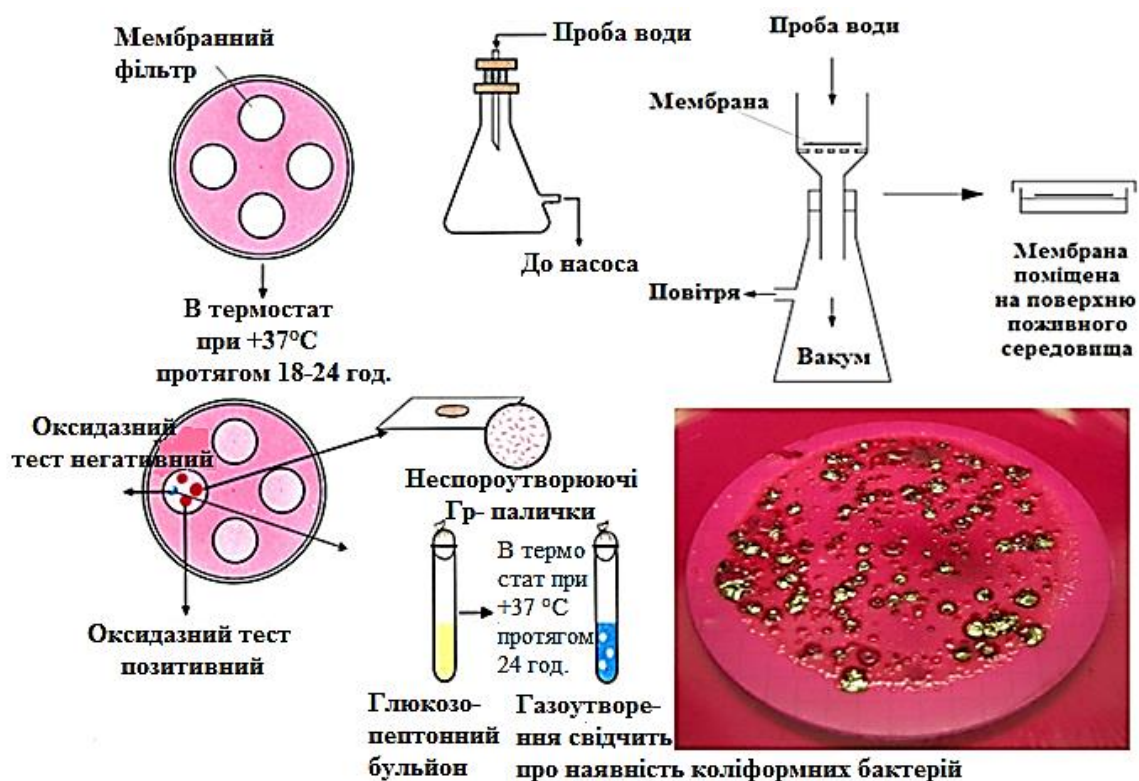
Здійснюють облік результатів визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів повітря. Вивчають апаратуру і поживні середовища, які використовують при санітарно-бактеріологічних дослідженнях об'єктів

навколишнього середовища. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Санітарно-мікробіологічний аналіз води

У зв'язку з тим, що визначення патогенних бактерій при біологічному аналізі води є непростим і трудомістким завданням, як критерій бактеріологічної забрудненості широкого розповсюдження набули методи непрямой оцінки епідеміологічного благополуччя шляхом підрахунку загальної кількості утворених колоній бактерій (**Colony forming Units - CFU**) в 1 мл води, отримане значення називають **загальним мікробним числом (ЗМЧ)**, а також виявлення так званих санітарно-показових мікроорганізмів. Для води такими санітарно-показовими мікроорганізмами в усі лабораторіях світу прийняті бактерії групи кишкової палички (БГКП). В основному для виділення бактерій і підрахунку ЗМЧ використовують **метод мембранных фільтрів**.



Сутність методу мембранных фільтрів полягає в концентруванні бактерій з певного об'єму досліджуваної води, яку пропускають через спеціальну мембрану з розміром пор 0.45 мкм. Для фільтрування використовують апарат Зейтца. При аналізі водопровідної води необхідно фільтрувати не менш як 333 мл, а при дослідженні води невідомої якості слід фільтрувати менші об'єми: наприклад 3, 30, 100, 200 мл. В результаті, на поверхні мембрани залишаються всі бактерії, що знаходяться у воді. Після цього мембрану з бактеріями поміщають на поверхню поживного середовища (Ендо) і культивують протягом 18-24 год. при температурі +30-37°C, після чого проводять підрахунок візуально добре помітних колоній.

Розрахунок індекса БГКП (кількість бактерій групи кишкових паличок у 1 л води) вираховують шляхом підрахунку кількості колоній БГКП, що вирости після посіву певної кількості води, помножують на 1000 і ділять на даний об'єм води.

Наприклад: при посіві 333 см³ води не вирости жодної колонії – $(1 \times 1000) : 333 = 3$, індекс БГКП менше 3; при посіві трьох об'ємів води по 100 см³ на одному фільтрі вирости три колонії коліформних бактерій, індекс БГКП = $(3 \times 1000) : 300 = 10$.

Визначення загального мікробного числа (загальна кількість мезофільних, мезотрофних аеробів і факультативних анаеробів, які виростають на МПА при +37°C протягом 24 год.) залежно від ступеня ймовірного бактерійного забруднення проводять шляхом посіву звичайної водопровідної або артезіанської води у нерозведеному стані в об'ємі 1 мл, а проби з відкритих водойм, криниць, джерел і т.д. сіють після попереднього їх розведення від 10⁻¹ до 10⁻³ і більше (особливо стічних вод). Відповідно до існуючих вимог звичайна водопровідна вода може містити не більше 100 мікробів в 1 мл. ЗМЧ відкритих водойм і криничної води не повинно перевищувати 1000.

Санітарно-мікробіологічний аналіз повітря

Седиментаційний метод (метод Коха)

Заснований на принципі осідання під дією сили тяжіння певної кількості бактерій на певну площу поживного середовища при певній температурі і за певний проміжок часу:

$$X = \frac{n \times 10^4}{75 \text{ см}^2 \times t,}$$

де X – ЗМЧ повітря досліджуваного приміщення (КУО);

n – кількість колоній на чашці (КУО);

t – час експозиції чашки (хв);

Pr^2 – площа чашки Петрі (см²) = 75 см²;

10⁴ – площа 1 м² (в см²).

Методика проведення мікробіологічного дослідження повітря з метою визначення наявності в повітрі гемолітичних стрептококів та золотистих стафілококів

Дві чашки Петрі з МПА або спеціальним агаром для гемолітичних стрептококів чи жовтково-сольовим агаром (ЖСА) для золотистих стафілококів відкривають і встановлюють на горизонтальній поверхні в місці взяття проби. Залежно від мікробного забруднення повітря експозиція чашок продовжується від 5-10 хв. при великій кількості бактерій до 20-40 хв. – при малій. Чашки закривають, інкубують 24 год. при +37°C і ще добу при кімнатній температурі.

Методика проведення мікробіологічного дослідження повітря з метою визначення ЗМЧ в 1 м³ повітря

Підраховують кількість усіх колоній в обох чашках і знаходять середнє арифметичне. За формулою Омелянського, на поверхню в 100 см² за 5 хв осідає

стільки бактерій, скільки їх міститься в 10 дм³ повітря. Наприклад, на чашці з поживним середовищем після 5 хв експозиції виросло 33 колонії. Площа стандартної чашки Петрі складає біля 66 см². На 100 см² агару виросло б $33 \times 100 : 66 = 50$ колоній, тобто це та кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря. Отже, в 1 м³ їх буде $50 \times 1000 : 10 = 5000$.

Аспіраційний метод Кротова

Принцип методу ґрунтується на використанні ударної дії повітряного струменя на поверхню поживного середовища й прилипанні до нього бактерій.

Розрахунок загального мікробного числа проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times 1000}{V},$$

де *a* – кількість колоній, що виросли в чашці Петрі;

V – об'єм пропущеного через прилад повітря, л;

1000 – заданий об'єм повітря для визначення ЗМЧ.

Приклад розрахунку: через прилад пропущено 100 л повітря; число колоній, що виросли – 370. Отже, кількість мікроорганізмів у 1 м³ повітря буде дорівнювати:

$$X = \frac{370 \times 1000}{100} = 3700.$$

Дослідження проводять за допомогою апарата Кротова, який може вловлювати високодисперсні фази мікробного аерозолі. При врахуванні росту підраховують число колоній на чашці. Метод використовують для відбору проб в наступних приміщеннях: післяопераційні палати, відділення і палати реанімації та інтенсивної терапії, а також інші приміщення, які потребують асептичних умов.

Санітарно-мікробіологічний аналіз ґрунту

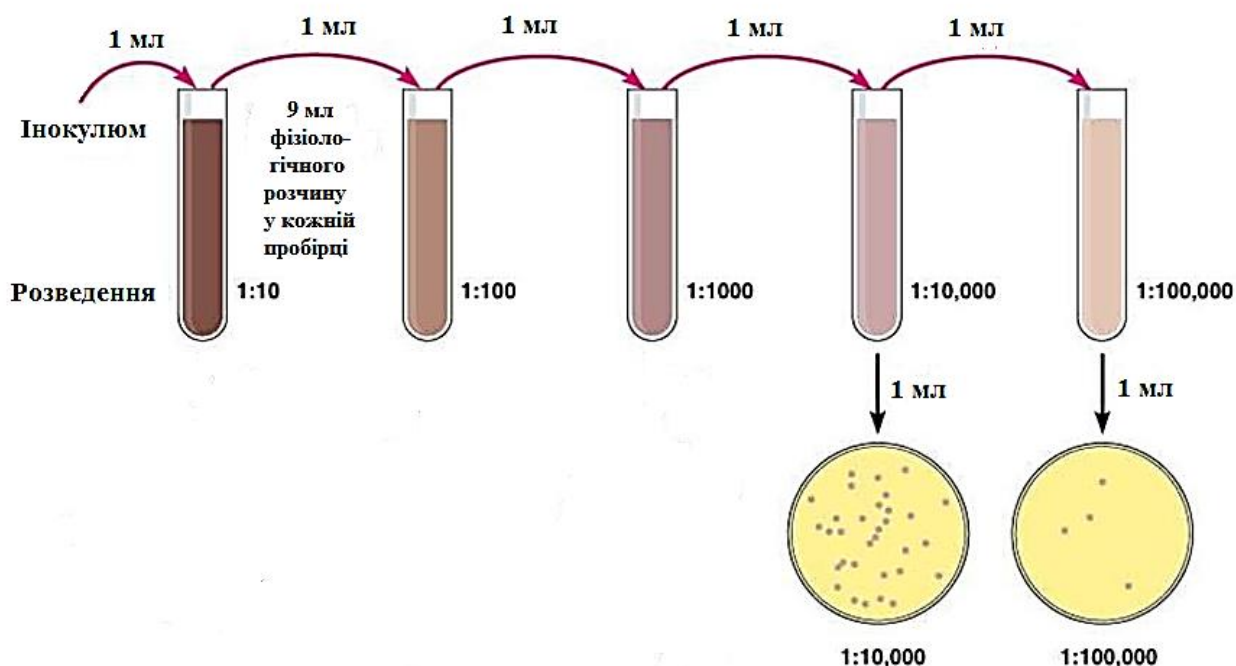
Оцінку ступеня забруднення ґрунту проводять шляхом визначення загального мікробного числа й кількісного аналізу основних індикаторних мікроорганізмів. Аналіз санітарного стану ґрунту включає визначення загального мікробного числа ґрунту (ЗМЧ), загальну кількість сапрофітних мікроорганізмів, наявність санітарно-показових бактерії групи кишкової палички (БГКП), фекальних ентерококів, *C. perfringens*, термофільних мікроорганізмів, *Proteus spp.*

Методика проведення мікробіологічного дослідження ґрунту

З метою визначення ЗМЧ в 1 м³ повітря

В стерильну банку беруть по 200-300 гр. проб ґрунту, які були відібрані у 4-5 точках вибраної ділянки на глибині 10-15 см, потім змішують, відбирають наважку 30 гр. і вносять у колбу, що містить 300 см³ стерильної води. Суміш ретельно збовтують протягом 10 хв, потім відстоюють 2-3 хв для осадження грубих частинок. Із отриманої суспензії готують серійні десятикратні розведення від 10⁻³ до 10⁻⁶ і більше. По 1 мл із останніх двох розведень вносять на дно двох стерильних

чашок Петрі й заливають 15 мл розтопленого і охолодженого до +45°C МПА. Після застигання чашки інкубують 48 год. при +28-30°C.



Із суми колоній, що вирости на двох чашках одного розведення, вираховують середнє арифметичне й визначають ЗМЧ. Наприклад: посіяно 1 мл суспензії ґрунту з розведенням 10^4 ; на чашці з агаром вирости в середньому 70 колоній; отже ЗМЧ $= 70 \times 10^4 = 7 \times 10^5$ бактерій.

Питання для самоконтролю

- Що вивчає санітарна мікробіологія?
- Значення санітарної мікробіології в діяльності лікаря.
- Санітарно-показові мікроорганізми води, повітря, ґрунту.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води.
- Визначення кількості бактерій-показників фекального забруднення: колі-індекс і колі-титр (методом мембранних фільтрів і бродильним).
- Роль води в передачі інфекційних захворювань.
- Методи визначення мікробного числа повітря.
- Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря (седиментаційний та аспіраційний).
- Оцінка санітарного стану закритих приміщень за загальним мікробним обміненням, наявністю стафілококів, α - і β -гемолітичних стрептококів.
- Патогенні мікроорганізми, які визначають в ґрунті.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження ґрунту.
- Мікробне число, колі-титр, перфрінгенс титр ґрунту.

Практичне заняття №42

Тема : «Санітарна вірусологія»

Актуальність теми:

У відношенні багатьох захворювань вірусної етіології відсутні ефективні заходи специфічної профілактики. В зв'язку з цим набувають більшу актуальність питання розробки неспецифічних профілактичних заходів, спрямованих на обмеження циркуляції в об'єктах довкілля вірусів, патогенних для людини. Вирішення цих питань – задача санітарної вірусології – нової галузі медичної науки. Таким чином, предметом санітарної вірусології є вивчення закономірностей циркуляції різноманітних патогенних для людини вірусів в об'єктах довкілля (повітря, ґрунт, вода), у харчових продуктах тощо, розробка методів їх індикації в об'єктах довкілля та ефективних заходів щодо їх санації. Основні розділи санітарної вірусології:

- 1) Санітарна вірусологія води.
- 2) Санітарна вірусологія ґрунту.
- 3) Санітарна вірусологія повітря.

Лікар повинен знати, як правильно брати досліджуваний матеріал, доставити його до лабораторії, провести вірусологічне дослідження, вірно оцінювати його результати.

Конкретні цілі:

- Трактувати поняття “санітарно-показові віруси” та роль їх як індикатора при оцінці ступеня контамінації патогенними мікроорганізмами об'єктів довкілля.
- Аналізувати якісний та кількісний склад вірусів води, ґрунту, повітря і робити висновки про їх безпечність в епідемічному відношенні.
- Інтерпретувати санітарно - вірусологічні критерії оцінки водних об'єктів, ґрунту та повітря закритих приміщень.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивитись практичне заняття №41.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Санітарна вірусологія	Наука, яка вивчає закономірності циркуляції різноманітних патогенних для людини вірусів в об'єктах довкілля (повітря, ґрунт, вода), у харчових продуктах тощо, розробляє методи їх індикації в об'єктах довкілля та ефективні заходи щодо їх санації.
Задачі санітарної вірусології	1. Розробка, удосконалення, оцінка вірусологічних методів дослідження об'єктів довкілля – води, повітря, ґрунту. 2. Оцінка шляхів впливу людини і тварин на довкілля.

	3. Розробка державних нормативів, методичних вказівок. 4. Розробка рекомендацій та заходів по оздоровленню довкілля та контроль за їх виконанням.
Санітарно-показові (індикаторні) віруси	В якості найбільш адекватного індикатора вірусного забруднення водних та інших об'єктів довкілля використовують бактеріофаги апатогенних ешеріхій (колі-фаги). Колі-фаги є вірусами бактерій. Вони схожі до вірусів людини за своїми біологічними властивостями і механізмом реплікації. Колі-фаги постійно присутні у кишечнику людини і з фекаліями у великій кількості потрапляють у стічні води. У водойми віруси надходять зі стічними водами та поверхневим стоком і як наслідок - у питну воду (водопровідну, колодязну та інші джерела). Методи визначення колі-фагів доступні лабораторіям різного рівня, не потребують спеціального обладнання і дають можливість отримати результати вже через 6–24 години.

Теоретичні питання до заняття:

- Санітарна вірусологія, предмет, завдання, значення санітарної вірусології в діяльності лікаря.
- Роль води, ґрунту, повітря у передачі збудників вірусних інфекцій. Віруси, які найчастіше знаходять в об'єктах докілля.
- Методи виявлення в ґрунті патогенних мікроорганізмів. Дослідження ґрунту на наявність ентеровірусів.
- Санітарно-вірусологічне дослідження води. Відбір проб, методи концентрації. Віруси, бактеріофаги у питних і стічних водах. Методи виявлення.
- Роль повітряного середовища у поширенні збудників респіраторних вірусних інфекцій. Методи відбору проб повітря та індикації респіраторних вірусів.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Вивчити алгоритми санітарно-вірусологічного дослідження стічної та питної води.
- Здійснити облік результатів титрації колі-фагу у стічній воді методами
- Аппельмана та Грація (демонстрація).
- Ознайомитися з нормативами допустимого рівня коліфагів у питній воді, воді поверхневих водоймищ, стічної води.

Зміст теми:

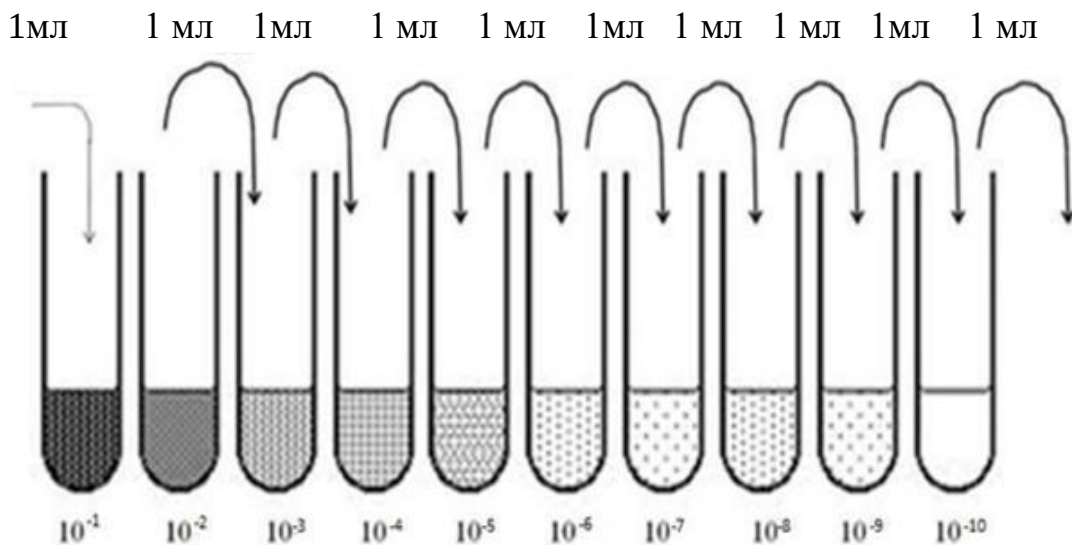
На практичному занятті студенти вивчають методи санітарно-вірусологічного дослідження води, повітря, ґрунту. Визначають титр колі-фагу у стічній воді методами Аппельмана та Грація. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Визначення титру колі-фагу стічної води методом Аппельмана

10 пробірок (з 10-ти кратним розведенням в 4,5 мл МПБ колі-фагу від 10^{-1} до 10^{-10} + тест-культура хазяїна *E.coli* B) і контролями: 11 пробірка – контроль тест – культури (4,5 мл МПБ + 0,1 мл *E.coli* B), 12 пробірка – контроль фагу (тільки 0,5 мл фагу). Підраховують титр фагу – це розведення при якому відбувається ще лізис бактерій (прозорий вміст пробірки). Роблять висновок.

Розведення колі-фага + тест-культура *E.coli*



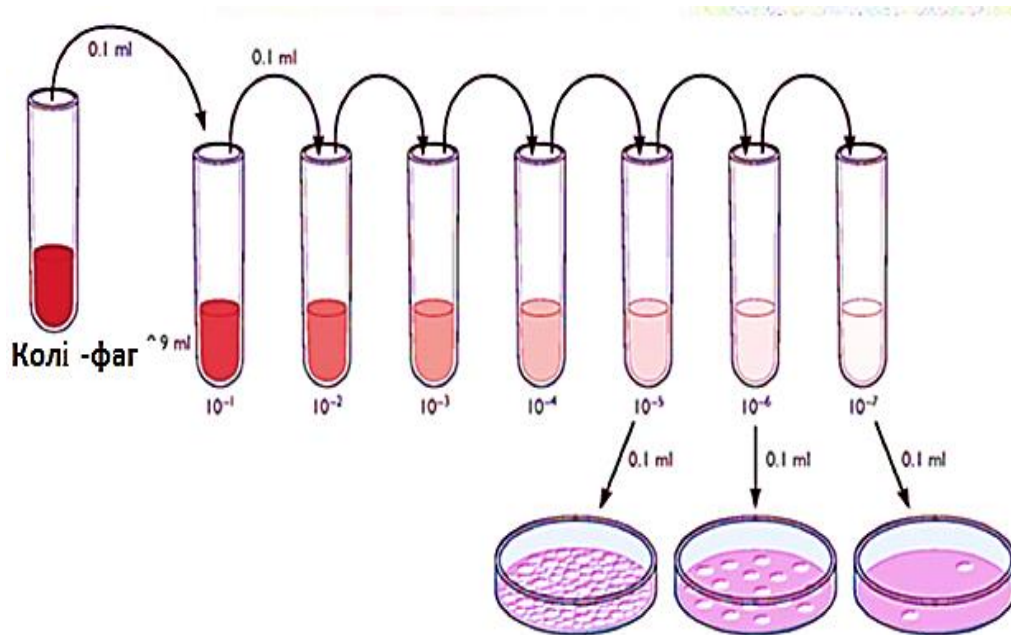
Визначення титру колі-фагу стічної води двошаровим методом посіву за Граціа

Схема проведення аналізу. Був розтоплений 2,0% МПА і розлитий у чашки Петрі по 15-20 мл в кожну. Флакони зі 100 см² 1,0% МПА розтоплюють і доводять до 48 °С на водяній бані. Приготовлені десятикратні розбавлення проби стічної води від 10^{-2} до 10^{-10} по 1 мл розливають у пробірки, додають 0,5 мл „нічної” бульйонної культури хазяїна, 5 мл розтопленого 1,0 % МПА та виливають на приготовлений заздалегідь шар 2,0 % МПА у чашках Петрі. Виливають приготовлену суміш (верхній шар) на нижній шар агару і швидко розподіляють по поверхні агару, дають можливість застигнути та інкубують у термостаті при $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

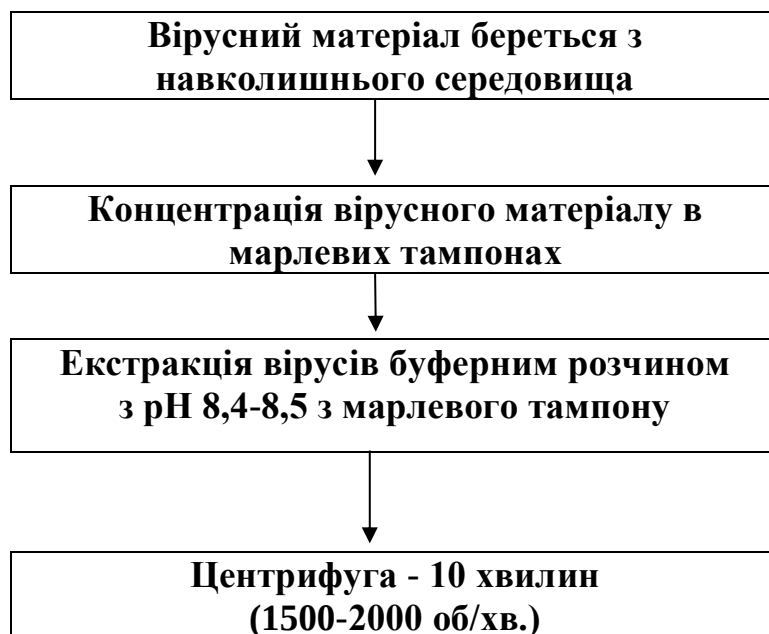
Титруючи фаги за методом Граціа, після добової інкубації підраховують число „негативних” колоній бактеріофагів на чашці Петрі. Кількість цих плям відповідає кількості фагів у засіяній суспензії. Підраховують кількість бляшок лізису культури хазяїна, тобто БУО (бляшкоутворюючих одиниць) в 1 мл вихідної суспензії (титр бактеріофагів): число колоній множать на розведення бактеріофагів.

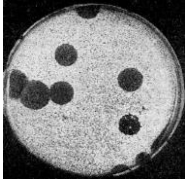
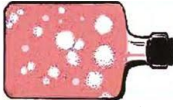
Наприклад, при розведенні 10^{-4} з'явилося 50 колоній, отже, титр фагів дорівнює: 50×10^{-4} або 5×10^{-5} в 1 мл.

Результат вважається прийнятим при одержанні відповідних позитивного (чутливість тест-культури до соматичних колі-фагів) та негативного (контамінація фагом середовищ) контролів. Допустимий рівень коліфагів в очищеній стічній воді, яку дозволено скидати у водоймище, повинен дорівнювати 1000 БУО/л.

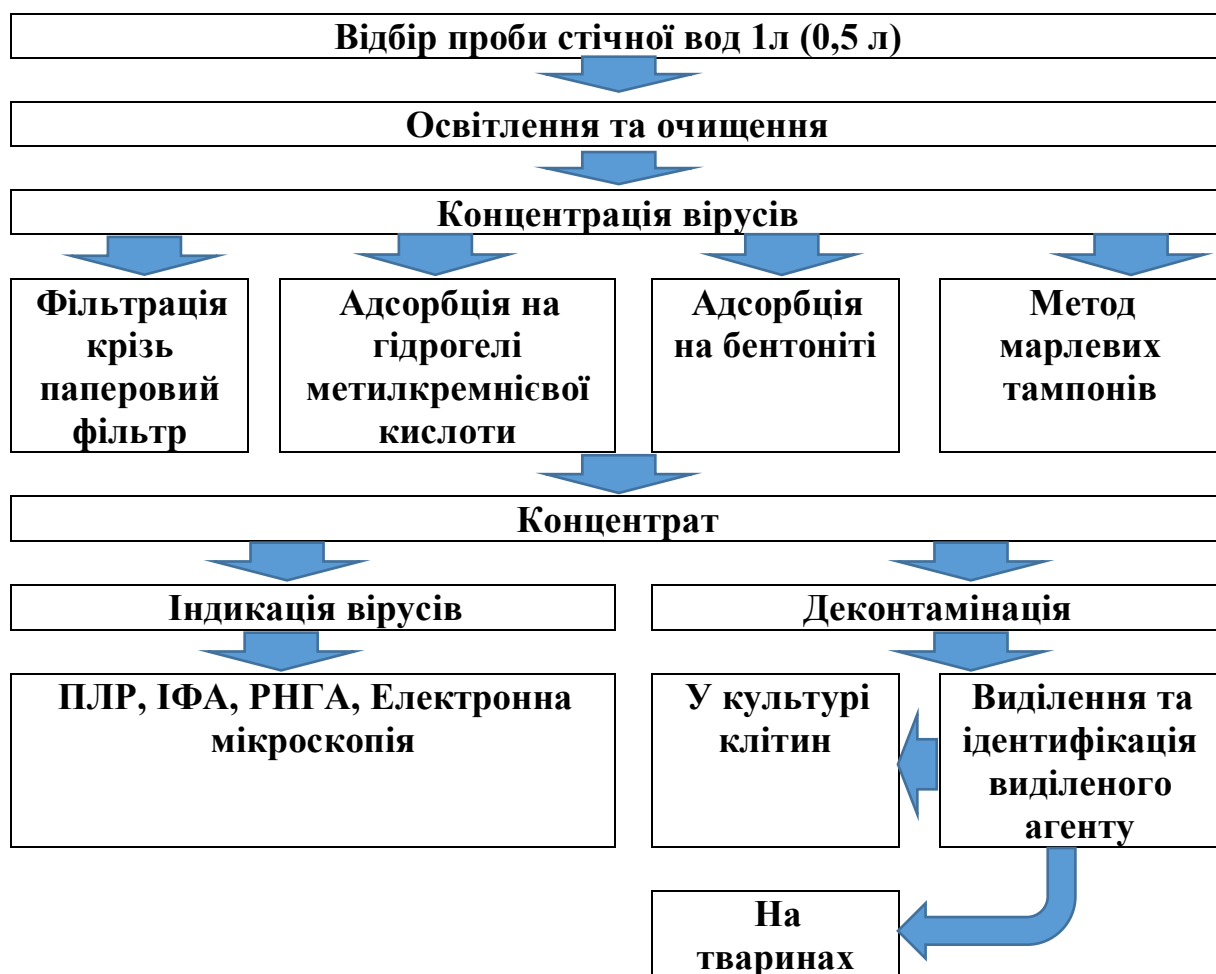


Відділення Колі-бактеріофагів та ентеровірусів із навколишнього середовища



Виділення коліфагів	Виділення ентеровірусів
1. 1 мл надосадової рідини вносять у в 2,5 мл розтопленого 0,7% МПА (42°), додають 0,1 мл індикаторних мікробів-<i>E.coli</i>, перемішують. 2. Виливають у чашки Петрі на поверхню 1,5% МПА, поміщають в термостат на добу при температурі 37° 3. Спостерігають появу бляшок бактеріофагів-зон лізису мікробів 	До 1 мл надосадової рідини додають розчини антибіотиків і вводять: 1. Новонародженим мишам (спостерігають параліч і смерть);  2. У культуру клітин в матраці, покритому шаром середовища з бентонітом (спостерігають бляшки ентеровірусів)  3. У культуру клітин в пробірках (спостерігають ЦПД ентеровірусів).

Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження стічної води



Питання для самоконтролю:

- Санітарна вірусологія, предмет, завдання, значення санітарної вірусології в діяльності лікаря.
- Роль води, ґрунту, повітря у передачі збудників вірусних інфекцій. Віруси, які найчастіше знаходять в об'єктах довкілля.
- Дослідження ґрунту на присутність ентеровірусів.
- Санітарно-вірусологічне дослідження води. Відбір проб, методи концентрації. Віруси, бактеріофаги у питних і стічних водах. Методи виявлення.
- Роль повітряного середовища у поширенні збудників респіраторних вірусних інфекцій.
- Методи відбору проб повітря та індикації респіраторних вірусів.

Практичне заняття №43

Тема: «Нормальна мікрофлора ротової порожнини. Роль бактерій, грибів, найпростіших в патології ротової порожнини (1 заняття)»

Актуальність теми:

У ротовій порожнині людини можна виявити чимало різних видів мікроорганізмів, оскільки умови є сприятливими для їхнього розвитку. Тут є достатня кількість поживних речовин, оптимальна температура і слабколужна реакція. Чимало мікроорганізмів заноситься в ротову порожнину ззовні разом з їжею, водою і повітрям. Особливо велику кількість бактерій можна виявити у порожнині рота біля шийок зубів і в проміжках між ними. Як і у всіх біологічних нішах, мікроорганізми ротової порожнини створюють своєрідний біоценоз, який в останні роки розглядається як стійка біологічна система, в якій існують складні взаємовідношення як між її складовими, так і з макроорганізмом. Основні елементи таких біоценозів включають аеробні та анаеробні бактерії, а також гриби та найпростіші. Серед мікроорганізмів ротової порожнини переважають стафілококи, стрептококи, лактобактерії, коринебактерії, спірили і спірохети, найпростіші, гриби. Зміни цього мікробіоценозу розвиваються на фоні порушення специфічної імунної відповіді та неспецифічних факторів захисту в тканинах порожнини рота.

Конкретні цілі:

- Вивчити склад нормальної мікрофлори ротової порожнини.
- Розглянути роль мікроорганізмів в формуванні мікробних асоціацій (на прикладі зубної бляшки).
- Вивчити за морфологічними та тинкторіальними ознаками мікрофлору зубного нальоту.
- Визначити роль грибів та найпростіших в складі нормальної мікрофлори ротової порожнини.
- Вивчити неспецифічні фактори захисту ротової порожнини.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивитись практичне заняття №41.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Резидентна мікрофлора (постійна, облігатна, аутохтонна)	Сукупність популяцій різних видів мікроорганізмів, яка склалась у ході еволюції, стійка до факторів порожнини рота і становить собою обов'язкову біологічну систему порожнини рота. Складається з представників усіх груп мікроорганізмів: бактерій, актиноміцетів, грибів, найпростіших, спірохет, вірусів (найбільш представлені біля 30 видів мікроорганізмів). Більше половини становлять стрептококи, вейлонели та

	дифтероїди. Значно меншу кількість – стафілококи, лактобацили, спірохети, лептоспіри, фузобактерії, бактероїди, нейсерії, найпростіші, жріжджі та інші гриби. У дорослої людини значна частина мікробів порожнини рота представлена анаеробними видам (бактероїди, вейлонели, фузобактерії, спірохети та ін.)
Транзиторна мікрофлора (тимчасова, випадкова, факультативна, алохтонна)	Це мікрофлора, що не є обов'язковою для порожнини рота і становить собою мікроорганізми, які потрапили з інших ділянок макроорганізму та навколишнього середовища разом з їжею, водою та повітрям. Час їх перебування у порожнині рота обмежений. Вони можуть бути сапрофітні, умовно-патогенні та патогенні. До тимчасових сапрофітних та умовно-патогенних бактерій відносять: грамнегативні палички, представники родів <i>Escherichia</i> , <i>Klebsella</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , грампозитивні бацили (<i>Bacillus subtilis</i>), клостридії (<i>C.putrificum</i> , <i>C.perfringens</i>), тетракоки та інші.
Мікробіоценоз (мікробна асоціація)	Сукупність популяцій різних видів мікроорганізмів, що мешкають в певному біотопі (наприклад, в порожнині рота). У біотопах навколишнього середовища, а також у здорових людей і тварин мікробіоценоз, як правило, складається з великого числа видів, що відносяться до облігатних і факультативних, аутохтонних і алохтонних мікроорганізмів.
Біоплівка	Складний (найчастіше мультивидовий) шар мікроорганізмів, що характеризується виділенням позаклітинної матриці, яка утримує мікроорганізми разом, виконує захисні функції та допомагає прикріплюватися до поверхонь. Біоплівки також звичайно характеризуються прикріпленням до твердої поверхні, структурною різноманітністю, значним генетичним різноманіттям, складними взаємодіями в межах угруповання і позаклітинною <u>матрицею</u> , складеною з полімерних речовин.
Пелікула	Ппохідне слини, складається з амінокислот і цукрів, з яких утворюються полісахариди. Існує думка, що пелікула утворюється на кристалах гідроксиапатитів. Роль пелікули неоднозначна: з одного боку, вона виконує захисну функцію, оберігаючи кристали емалі від дії кислот, що поступають в порожнину рота, з іншого — сприяє прикріпленню мікроорганізмів і утворенню їх колоній — зубного нальоту.
Зубний наліт	Скупчення бактерій у вигляді плівки, що утворюється на зубах. Зубний наліт включає як з аеробні, так і, факультативно анаеробні бактерій і починає утворюватися вже через 1-2 години після чищення зубів. Поступово кальцифікується та перетворюється на твердий субстрат, який називають зубним каменем. Його основу складає зубний наліт. Зубний наліт в першу чергу утворюється в недоступних для чищення місцях — у фіссурах, ямках, на контактних поверхнях. Він виявляється

	при фарбуванні еритрозином. Розрізняють зубний наліт під'ясенний, такий, що утворюється під яснами, і над'ясенний, що локалізується над яснами.
Зубна бляшка	Вільне утворення, яке розташоване над пелікулою і складається з мікроорганізмів, розташованих усередині матриці, що утворюється за рахунок білків, полісахаридів, ліпідів і деяких неорганічних речовин (кальцію, фосфатів, магнію, калію, натрію).
Неспецифічні фактори захисту	Вроджені та позбавлені вибіркової чинники ланки захисту організму від агресивних агентів зовнішнього та внутрішнього середовища. Виділяють механічний, хімічний і фізіологічний механізми дії чинників неспецифічного захисту ротової порожнини. Механічний захист здійснює бар'єрну функцію неушкодженої слизової оболонки шляхом змивання мікроорганізмів слиною, очищення слизової оболонки в процесі їди, адгезії на клітках слизового епітелію. Слина, крім того що змиває мікроорганізми, діє і бактерицидно, завдяки наявності в ній біологічно активних речовин (лізоциму). Хімічні і фізіологічні механізми захисту. Лізоцим (фермент ацетилмурамидаза) - муколітичний фермент. Він виявлений у всіх секреторних рідинах, але в найбільшій кількості в слізній рідині, слині, мокроті. Лізоцим лізує оболонку деяких мікроорганізмів, в першу чергу грампозитивних. Крім того, він стимулює фагоцитарну активність лейкоцитів, бере участь в регенерації біологічних тканин.

Теоретичні питання до заняття:

- Мікробіоценоз ротової порожнини. Резидентна та транзитрна мікрофлора. Якісний і кількісний склад нормальної мікрофлори ротової порожнини.
- Біологічні властивості грибів та найпростіших в складі нормальної мікрофлори ротової порожнини.
- Неспецифічні фактори захисту ротової порожнини.
- Фізіологічна роль мікробних асоціацій. Формування зубної бляшки.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Записати якісний і кількісний склад нормальної мікрофлори ротової порожнини.
- Визначити неспецифічні фактори захисту ротової порожнини та записати основні до лабораторного зошиту.
- Розглянути механізм формування мікробної асоціації (зубної бляшки) та визначити роль мікроорганізмів у цьому процесі.
- Зробити препарат-мазок з зубного нальоту, пофарбувати за Грамом і описати знайдену мікрофлору та замалювати.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти повинні записати склад нормальної мікрофлори ротової порожнини, розглянути систему місцевого імунітету слизової оболонки порожнини рота, визначити роль мікроорганізмів у формуванні мікробних асоціацій ротової порожнини, самостійно провести бактеріоскопічне дослідження мікрофлори ротової порожнини, замалювати та записати представників. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Якісний та кількісний склад основної мікрофлори ротової порожнини (КУО/мл слини)

Якісний та кількісний склад основної мікрофлори ротової порожнини Кількість в 1 мл слини (в нормі)	Кількість в 1 мл слини (в нормі)	Частота виявлення в пародонтальних кишнях, %
Резидентна флора		
1.Аероби та факультативні анаероби		
<i>S. mutans</i>	$1,5 \times 10^5$	100
<i>S. salivarius</i>	10^7	100
<i>S. mitis</i>	$10^6 - 10^8$	100
Сапрофітні нейсерії	$10^5 - 10^7$	++
Лактобактерії	$10^3 - 10^4$	+
Стафілококи	$10^3 - 10^4$	++
Сапрофітні мікобактерії	Не виявл.	++
Гриби роду <i>Candida</i>	$10^2 - 10^3$	+
Мікоплазми	$10^2 - 10^3$	Не виявлені
2.Облігатні анаероби		
Вейлонели	$10^6 - 10^8$	100
Пептострептококи	Не виявл.	100
Бактероїди	Не виявл.	100
Фузобактерії	$10^2 - 10^3$	100
Ниткоподібні бактерії	$10^2 - 10^4$	100
Актиноміцети	Не виявл.	++
Спирили та вібріони	Не виявл.	++
Спірохети (сапрофітні борелії, трепонеми, лептоспіри)	Не виявл.	100
3.Найпростіші		
<i>Entamoeba gingivalis</i>	0	45
<i>Trichomonas elongate</i>	0	25

Примітка. ++ виявляються частіше; + виявляються рідше.

Система органів місцевого імунітету ротової порожнини та ротоглотки представлена мигдаликами системи лімфоглоткового кільця Вальдейера-

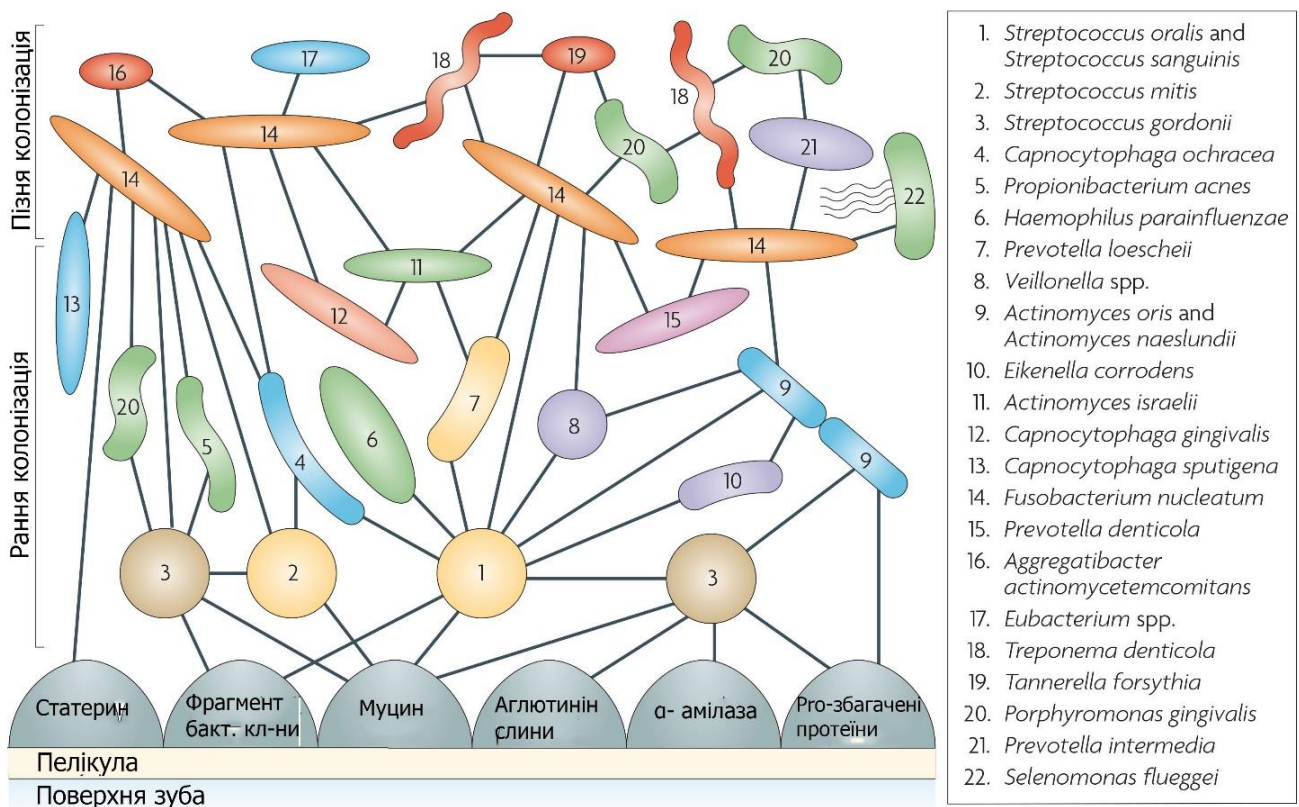
Пирогова, слинними залозами, лімфатичними вузлами, мукозоасоційованою лімфоїдною тканиною.



Система місцевого імунітету слизової оболонки ротової порожнини.

GALT (gut-associated lymphoid tissue) — лімфоїдна тканина, асоційована з кишечником; BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) — лімфоїдна тканина, асоційована з бронхами; SALT (skin-associated lymphoid tissue) — лімфоїдна тканина, асоційована зі шкірою.

В умовах біоплівки мікробіоценоз ротової порожнини набуває нових властивостей, а саме здатності до «соціальної поведінки мікроорганізмів» («quorum sensing»). Саме існування цього феномену пояснює, чому певний рівень наявності умовно-патогенної мікрофлори не призводить до виникнення патологічних змін у слизовій оболонці ротової порожнини. Збільшення кількості умовно-патогенних бактерій стимулює появу патогенних властивостей та ураження ротової порожнини. Важливим питанням, що стосується мікробіоценозу порожнини рота, є взаємовідносини між нормальною та умовно-патогенною мікрофлорою. Здатність організму до підтримання стабільності мікроекології певної біологічної ніші реалізує система колонізаційної резистентності.



Бактеріальна колонізація ротової порожнини. Формування мікробних асоціацій (зубна бляшка).

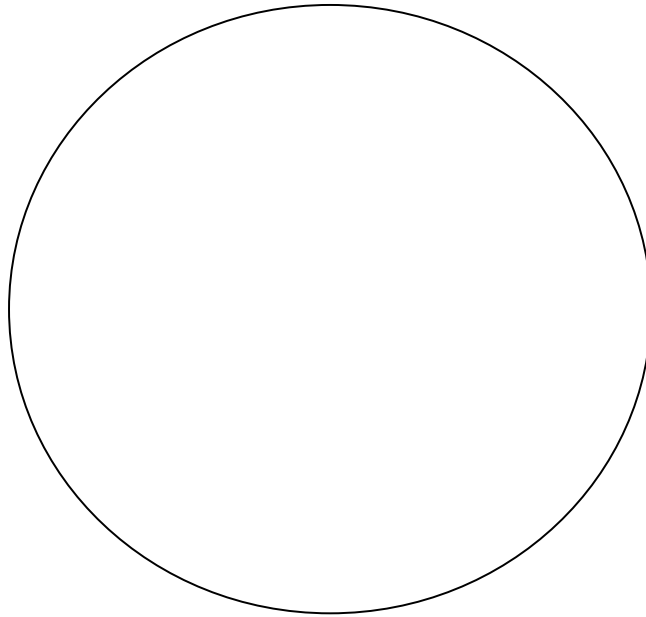
Колонізаційна резистентність ротової порожнини — це її опірність (стійкість) до патологічної та надлишкової колонізації мікрофлорою (бактерії, гриби, віруси, найпростіші та ін.).

Система колонізаційної резистентності ротової порожнини представлена:

1. мікроекологічними нішами (біотопами) — зубною бляшкою, поверхнями різних ділянок слизової оболонки (язика, щік, губ, під'язикової ділянки, піднебіння, мигдаликів); ротовою рідиною; біотопами ясеневих борозн, вивідних протоків слинних залоз;
2. мікрофлорою кожного біотопа, з особливостями якісного та кількісного складу;
3. механізмами активності бактерій нормальної мікрофлори (симбіонтів) (антагоністичної та синергічної);
4. механізмами неспецифічної резистентності ротової порожнини.

Завдання 1. Приготувати препарат із власного зубного нальоту, пофарбувати за Грамом і зробити малюнок у протоколі, на якому позначити різні бактерії.

Мікрофлора зубного нальоту (за Грамом)



Питання для самоконтролю.

1. Який склад нормальної мікрофлори ротової порожнини?
2. Яка роль мікроорганізмів в формуванні мікробних асоціацій?
3. Неспецифічні фактори захисту ротової порожнини, їх роль у підтриманні мікробіоценозу ротової порожнини.
4. Механізм формування зубної бляшки

Практичне заняття №44

Тема: «Нормальна мікрофлора ротової порожнини. Роль бактерій, грибів, найпростіших в патології ротової порожнини (2 заняття)»

Актуальність теми:

В порожнині рота знаходиться десятки мікроорганізмів серед яких зустрічаються аероби і анаероби, паразити і сапрофіти. При порушенні імунітету відмічають збільшення кількості умовно-патогенної мікрофлори та стійке порушення складу мікробіоценозів ротової порожнини з розвитком уражень зубів та тканин пародонту. Характер колонізаційної резистентності є одним із провідних фізіологічних і патогенетично значимих чинників формування та прогресування стоматологічних захворювань. Причиною найбільш поширених стоматологічних захворювань є мікроорганізми порожнини рота. Найбільша їх кількість міститься в різних зубних нашаруваннях, а також у слині і на поверхні слизової оболонки язика.

Конкретні цілі:

- Ознайомитись з основними патологічними процесами, які викликають мікроорганізми в ротовій порожнині.
- Вивчити роль мікроорганізмів та мікробних асоціацій в патогенезі карієсу і захворювань пародонта.
- Розглянути методи мікробіологічної діагностики захворювань ротової порожнини.
- Аналізувати методи корекції та лікування захворювань ротової порожнини, спричиненими мікроорганізмами.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №41.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Карієс	Патологічний процес, що виявляється після прорізуванні зубів, при якому відбувається демінералізація та розмякшення твердих тканин зуба з подальшим утворенням дефекту у вигляді порожнини.
Пародонтит	Запальне захворювання ясен. Його розвиток, як правило, провокують мікроорганізми, що потрапили в травмовані м'які тканини ясен - в цьому випадку лікарі говорять про розвиток гострого пародонтиту. Крім того, спровокувати пародонтит може зубний наліт або камінь - якщо їх вчасно не видаляти, то підясенні кишені заповнюються нальотом, що містить продукти життєдіяльності мікроорганізмів і руйнівно впливають на тканини пародонту.

Гінгівіт	Запальне захворювання тканин <u>ясен</u> , що перебігає в гострій або хронічній формі. Зазвичай захворювання спричинює мікробна флора порожнини рота. При недостатньому догляді за порожниною рота на зубах накопичується наліт, в якому розвиваються колонії мікроорганізмів, утворюється мікробна плівка. Цей наліт може мінералізуватися, формуючи зубний камінь, що є однією з причин розвитку гінгівіту.
Стоматит	Запалення слизової оболонки ротової порожнини.
Виразково-некротичний стоматит Венсана	Змішана інфекція, викликана двома збудниками – представниками аутохтонної мікрофлори ротової порожнини – фузобактеріями (рід <i>Fusobacterium</i>), що відносяться до родини <i>Bacteroidaceae</i> , та бореліями (рід <i>Borrelia</i>), представниками родини <i>Spirochaetaceae</i> .

Теоретичні питання до заняття:

- Резидентна мікрофлора ротової порожнини. Роль при патологічних станах.
- Роль мікроорганізмів і їх факторів агресії в розвитку карієсу зубів.
- Вплив місцевих і загальних факторів у розвитку пародонтиту. Етіологічна роль мікрофлори, патогенез і форми пародонтиту.
- Роль мікроорганізмів в розвитку гінгівітів. Форми прояву гінгівітів.
- Виразково-некротичний стоматит Венсана. Етіологія, патогенез.
- Методи мікробіологічної діагностики захворювань ротової порожнини.
- Методи корекції та лікування захворювань ротової порожнини, спричиненими мікроорганізмами.

Практичні завдання, які виконуються на занятті:

- Записати склад мікрофлори ротової порожнини при патологічних станах.
- Внести до протоколу основні патологічні процеси, які викликають мікроорганізми в ротовій порожнині.
- Розглянути роль мікроорганізмів зубного нальоту в етіології та патогенезі карієсу зубів.
- Дослідити демонстраційні препарати, приготовані з матеріалу хворих пародонтитом і виразково-некротичним стоматитом Венсана.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти повинні записати склад мікрофлори ротової порожнини при патологічних станах, навести окремі приклади, ознайомитись з механізмом розвитку карієсу та визначити роль мікроорганізмів в патогенезі, розглянути та замалювати демонстраційні препарати, приготовані з матеріалу хворих пародонтитом і виразково-некротичним стоматитом Венсана. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Склад мікрофлори ротової порожнини при патологічних станах

ПРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ	
Карієс	<i>Str. mitis</i> біовар 1, <i>Str. gordonii</i> , <i>Str. sanguis</i> , <i>Str. oralis</i> , <i>Str. mutans</i> , актиноміцети, лактобактерії
Ускладнений карієс	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Candida</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Eubacteria</i>
Гінгівіт	<i>Actinomyces: naeslundii</i> , <i>viscosus</i> , <i>israelii</i> ; <i>Str. sanguis</i> , <i>Str. mitis</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Selenomonas sputigena</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , пептострептококи, <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Campylobacter sputorum</i> , вейлонели
Хронічний пародонтит	Клон 1025 TM7, <i>Fusobacterium nucleatum animalis</i> , <i>Atopobium parvulum</i> , <i>Eubacterium spp.</i> штам PUS9.170, <i>Abiotrophia adiacens</i> , <i>Dialister pneumonitis</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Selenomonas spp.</i> штам GAA14, <i>Str. Constellatus</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Wolinella recta</i> , <i>Treponema spp.</i> штам I:G:T21, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Atopobium rimae</i> , <i>Megasphaera spp.</i> клон BB166, <i>Catonella morbi</i> , <i>Eubacterium saphenum</i> , <i>Gemella haemolysans</i> , <i>Campylobacter gracilis</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Prevotella tanneriae</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i>
Гострий локалізований пародонтит	<i>Eikenella corrodens</i> , <i>Capnocytophaga sputigena</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
Стоматит	Бактерії: аутохтонні — <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Micrococcus spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Veillonella spp.</i> , <i>Bacteroides spp.</i> , алохтонні — <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Campylobacter spp.</i> ; мікрофлора із зовнішнього середовища — <i>Trichomonas spp.</i> , <i>Mycoplasma spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Leptospira spp.</i> Гриби: <i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> . Віруси: <i>Picornaviridae</i> (Enterovirus — вірус Коксакі А типу 16, ентеровірус типу 71), <i>Herpesviridae</i> (<i>Herpes simplex virus 1/2</i> , <i>Herpes zoster virus</i> , <i>Cytomegalovirus</i> , <i>Epstein-Barr virus</i> , <i>Herpes virus 6, 7, 8</i>), вірус імунodefіциту людини, <i>Human papillomavirus</i>

(неонкогенні — 1, 2, 3, 5, онкогенні низького онкогенного ризику — 6, 11, 42, 43, 44, онкогенні високого онкогенного ризику — 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68).
Найпростіші: *Trichomonas tenax*, *Entamoeba gingivalis*.

При розгляді механізмів виникнення карієсу зуба звертає на себе увагу різноманіття різних чинників, взаємодія яких і обумовлює виникнення вогнища демінералізації.

Основні етіологічні чинники розвитку карієсу:

1. мікрофлора порожнини рота;
2. характер і режим харчування, вміст фтору у воді;
3. кількість і якість слиновиділення;
4. загальний стан організму;
5. екстремальні дії на організм.

Місцеві чинники розвитку карієсу:

1. зубна бляшка і зубний наліт, що ізолюється мікроорганізмами;
2. порушення складу і властивостей ротової рідини;
3. вуглеводні липкі харчові залишки порожнини рота;
4. резистентність зубних тканин, обумовлена повноцінною структурою і хімічним складом твердих тканин зуба;
5. відхилення в біохімічному складі твердих тканин зуба і неповноцінна структура тканин зуба;
6. стан пульпи зуба;
7. стан зубощелепної системи в період закладки, розвитку і прорізування постійних зубів.



Патогенез карієсу.

Карієсогенна дія мікроорганізмів пов'язана з утворенням зубного нальоту. Спочатку до пелікули адсорбується моношар мікроорганізмів (ранні колонізатори, наприклад, *S. sanguinis* та *S. gordonii*), на які поступово накладаються нові

нашарування. Матрикс зубного нальоту складається з полісахаридів, протеїнів і незначної кількості ліпідів. Важливе місце в складі матриксу нальоту належить декстрану - полісахариду, який продукують стрептококки, який сприяє їх прикріпленню до поверхні зуба. Погана гігієна ротової порожнини, дієта з високим вмістом цукру та інші слюнні, імунологічні та мікробні фактори призводять до розвитку патогенної біоплівки (дисбактеріозу). Серед всіх карієсогенних стрептококів особливе місце займає *Streptococcus mutans*, вперше виділений Кларком (1924).

Методи мікробіологічної діагностики захворювань ротової порожнини

1. Мікроскопія пофарбованих та нативних препаратів.
2. Метод імунофлюоресценції.
3. Виділення чистих культур та ідентифікація збудників (бактерій, спірохет, мікоплазм, актиноміцетів, грибів, найпростіших тощо).
4. Виділення та ідентифікація вірусів.
5. Серологічна діагностика.

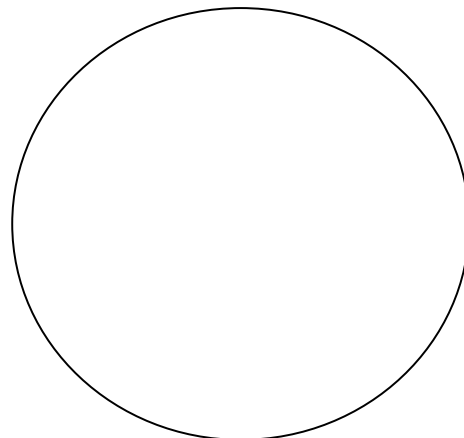
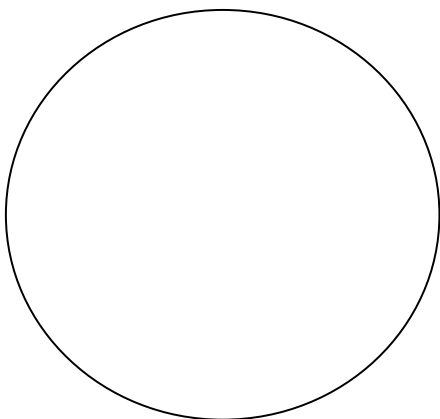
Способи відновлення нормальної мікрофлори та підтримання її функціонального стану:

- антисептиків;
- пробіотиків, пребіотиків та синбіотиків;
- імуномодуляторів бактеріального походження.

Способи відновлення та підтримання нормальної функції імунної системи слизових оболонок:

- специфічна імуномодуляція із застосуванням імуномодуляторів бактеріального походження;
- заміщення функції шляхом використання препаратів, що містять фактори неспецифічного імунітету;
- нормалізація показників загального імунітету шляхом використання імуномодуляторів.

Завдання 1. Дослідити демонстраційні препарати, приготовані з матеріалу хворих пародонтитом і виразково-некротичним стоматитом Венсана.



Питання для самоконтролю.

- Яка роль нормальної мікрофлори людини в нормі і патології?
- Які причини розвитку дисбактеріозу?
- Яка роль мікроорганізмів і їх факторів агресії в розвитку карієсу зубів?
- Вплив місцевих і загальних факторів у розвитку пародонтиту. Етіологічна роль мікрофлори, патогенез пародонтиту.
- Роль мікроорганізмів в розвитку гінгівітів.
- Методи мікробіологічної діагностики захворювань ротової порожнини.
- Засоби корекції та лікування захворювань ротової порожнини

Практичне заняття № 45

Тема: «Патогенетичні закономірності бактеріальних і вірусних інфекцій з переважним ураженням центральної нервової системи та їх лабораторна діагностика»

Актуальність теми:

Проблема нейроінфекцій стала актуальною знову на рубежі століть і отримала значимість у осіб молодого і середнього віку. Дана ситуація пов'язана зі зниженням ефективності основних груп антибіотиків на тлі неконтрольованого їх використання, збільшенням числа осіб з первинним і вторинним імунodefіцитом, а також з рядом антропогенних чинників, що призвели до зростання інфекційної захворюваності. Нейроінфекції викликаються бактеріями, вірусами, пріонами, грибами, найпростішими. Неврологічні порушення можуть розвиватися в результаті безпосереднього проникнення збудника в нервову систему (нейроінфекції). Іноді вони розвиваються на тлі інших захворювань. Вибірковість ураження мозку при нейроінфекціях обумовлена так званим нейротропізмом інфекційно-токсичних агентів. Термін "нейротропізм" означає спорідненість інфекційного збудника до нервової клітки. Тропізм вірусів визначається подібністю будівлі рибонуклеинових кислот вірусу і нервової клітини. Це робить можливим, наприклад, проникнення вірусу всередину клітини; таке проникнення призводить до порушення внутрішньоклітинного обміну або до загибелі нейрона. Відомо понад 800 вірусів патогенних для людей. Кожен вид збудника є етіологічним чинником певного патологічного процесу.

Завдяки захисним заходам організму поразки нейронів часто виявляються оборотними, але враження пріонами завжди фатальні. Важливе значення має своєчасна лабораторна діагностика захворювань з ураженням нервової системи, їх специфічна профілактика і лікування.

Конкретні цілі:

- Проаналізувати біологічні властивості вірусів, що уражають нервову систему. Створити перелік таких вірусів і назвати патологічні процеси.
- Пояснювати патогенетичні закономірності захворювань з ураженням нервової системи.
- Визначати методи лабораторної діагностики, етіотропної терапії та специфічної профілактики таких захворювань.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивись практичне заняття №41

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Нейроінфекція	Це загальна назва інфекційних захворювань, які викликаються бактеріями, вірусами, грибами або найпростішими і

	характеризуються переважною локалізацією збудника інфекції в центральній нервовій системі і клінічними ознаками ураження будь-яких її відділів.
Види нейроінфекцій	Інфекційні збудники можуть вражати різні відділи головного мозку і викликати наступні захворювання: енцефаліт являє собою інфекційне запалення тканин головного мозку; мієліт – інфекційне запалення спинного мозку; арханіодіт - інфекційне запалення павутинної оболонки мозку; менінгіт - інфекційне запалення, яке поширюється на всі оболонки головного мозку.
Типи нейроінфекцій	Первинні - при початковому ураженні нервової системи. Вторинні - при зараженні нервової системи з раніше існуючого в організмі вогнища запалення.

Теоретичні питання до заняття.

- Вивчити морфологічні, тинкторіальні та культуральні властивості бактеріальних збудників інфекцій з переважним ураженням нервової системи.
- Вивчити морфологічні, тинкторіальні та культуральні властивості вірусних збудників інфекцій з переважним ураженням нервової системи.
- Ознайомитися зі структурою і фізіологічними особливостями пріонів як інфекційних агентів, які вражають центральну нервову систему людини і тварин.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Створити перелік вірусів, які можуть спричинити ураження нервової системи.
- Визначити таксономічне положення вказаних вірусів, назвати нозологічні форми захворювань.
- Ознайомитись з біологічними властивостями основних представників таких вірусів.
- Створити схеми методів лабораторної діагностики захворювань з переважним враженням центральної нервової системи (бактеріоскопічний, бактеріологічний, біологічний, алергічний, генетичний).
- Вивчити діагностичні та профілактичні препарати, які використовують при інфекціях з елементами ураження нервової системи.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти, використовуючи методичні матеріали кафедри (таблиці, схеми тощо) створюють перелік вірусів, що вражають нервову систему, визначають їх таксономічне положення, нозологічні форми захворювань. Знайомляться з біологічними властивостями типових представників таких вірусів, з схемами лабораторної діагностики та препаратами для специфічної профілактики.

Виконані завдання студенти записують у протокол і підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу.

Віруси, які викликають захворювання ЦНС у людини

Родина	Рід	Представник	Серо- та гено-діagnostика	Симптоми та захворювання
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i>	Лімфоцитарного хориоменінгіту, Ласса	РН, РЗК, ІФА, ІХА, РІА, ПЛР	Менінгіт, менінгоенцефаліт, вроджена гідроцефалія
		Хунін, Мачупо, Сібіа, Гуанаріто, Моппейя, Мобала і Кваранфіл		Загальна неврологічна симптоматика
<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Цитомегаловірус	РЗК, РНГА, РІФ, ІФА, ІФМ, ПЛР	Мікроцефалія, гідроцефалія, розумова відсталість, затримка інтелектуального розвитку, хоріореніт, дефекти моторики
	<i>Rhadinovirus</i>	Вірус мавп В	ПЛР	Менінгіт, менінгоенцефаліт, мієліт
	<i>Simplexvirus</i>	ВПГ-1, ВПГ-2	РЗК, РІФ, ІФА, ІФМ, ПЛР	Підвищена дратівливість, паралічі, епілептиформні припадки, кома, тремор, летаргія. Менінгіт, менінгоенцефаліт, енцефаліт
	<i>Varicellovirus</i>	Герпес-зостер	РНФ, ІФА, РП в гелі, ПЛР	Енцефаліти, кортикальна атрофія, епілептиформні припадки, психомоторні порушення, паралічі, м'язова атрофія, хоріореніт.
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenza virus</i>	Influenza virus A	РГГА, РНГА, РЗК, ІФА, РНМФА, ПЛР	Менінгіт, енцефаліт, менінгоенцефаліт,
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Morbillivirus</i>	Вірус кору	РЗК, РН, РГГА, РІФ, ІФА, ПЛР	Енцефаліт, підгострий паненцефаліт
	<i>Rubulavirus</i>	Вірус епідемічного паротиту	РГГА, РНМФА, РЗК, ІФА, ПЛР	Менінгіт, менінгоенцефаліт, енцефаліт, втрата слуху.
<i>Picornaviridae</i>	<i>Cardiovirus</i>	Вірус енцефало-міокардита	РН, РЗК, ІФА, ПЛР, МФА	Менінгіт, енцефаліт, мієлоенцефаліт, поліомієлітоподібні паралічі
	<i>Enterovirus</i>	Поліовірус 1-3 типів, ЕСНО, Коксаки А 2,4,7,9,10 типів, Коксаки В 1-6	РН, РЗК, ІФА, ПЛР, МФА	Поліомієлітоподібні паралічі, менінгіт, менінгоенцефаліт
<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	ВІЛ-1, ВІЛ-2	РІА, ІФА, Імуноблотинг, ПЛР	Пізнавально-рухові розлади, підгострий гігантоклітинний енцефаліт із ділянками демієлінізації, енцефалопатія, мієлопатія, лейкоенцефалопатія, деменція
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	Сказ	РІФ, РЗК, ІФА, РН, ПЛР	В результаті ураження клітин ЦНС та гангліїв - гідрофобія, аерофобія, галюцинації, мовне та

				рухове збудження, паралічі.
<i>Togaviridae</i>	<i>Rubivirus</i>	Краснуха (червінка)	РІФ ІФА РНГА РГГА РН РЗК ПЛР	Менінгіт, менінгоенцефаліт, мікроцефалія, психомоторні порушення, психічна нестійкість, порушення мови
	<i>Alphavirus</i>	Віруси Сіндбіс, О'Ньонг-Ньонг, Росс-Рівер, Гета, Чікугунья, Мукамбо, Тонате, Бебару, енцефаломієліта коней та інші.		Енцефаліти різної етіології, менінгіти, ступори, паралічі, кома
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	<i>Zika virus</i>	ІФА РІФ ПЛР	Неврологічні розлади, вроджені аномалії розвитку ЦНС (вроджена мікроцефалія)
<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopox virus</i>	<i>Variolla vera</i>	РГГА РЗК РІФ РНГА	Енцефаліт, менінгоенцефаліт
<i>Reoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado thick encephalitis</i> колорадський кліщовий енцефаліт	РНГА РН РЗК РІФ ІХА ПЛР	Енцефаліт

Методи діагностики вірусних інфекцій

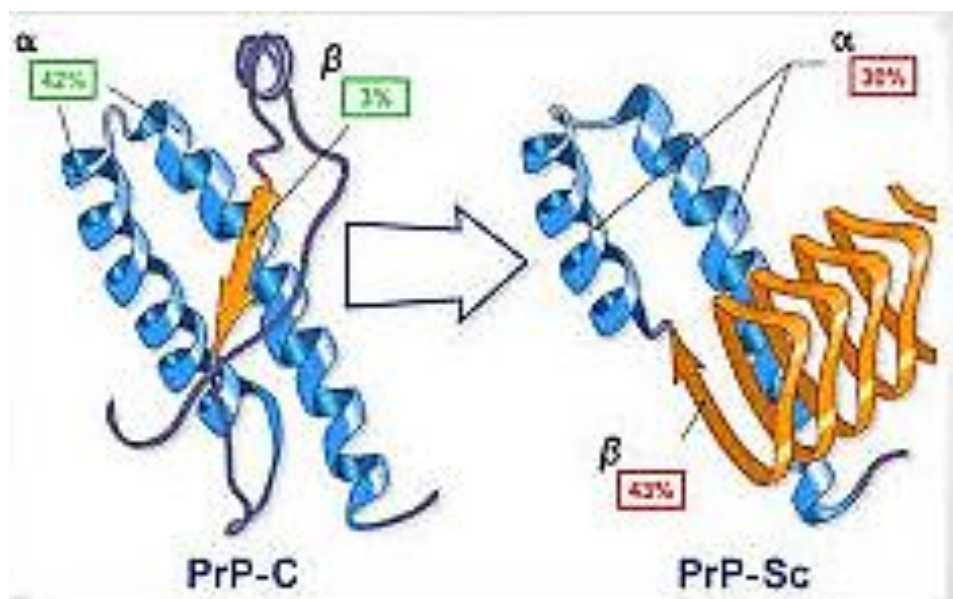
1. *Вірусоскопічний*. Пряме виявлення віріонів в матеріалі від хворого за допомогою електронної мікроскопії.
2. *Вірусологічний*. Виділення вірусів із клінічного матеріалу та їх ідентифікація.
3. *Серологічна діагностика* – виявлення зростання титру противірусних антитіл в парних сироватках хворого.
4. *Генодіагностика* – виявлення вірусних НК в матеріалі хворого.

Основні бактеріальні нейроінфекції

1. Нейросифіліс;
2. Бактеріальні менінгіти (*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (B), *Staphylococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* і *Haemophilus influenzae*; spp. *Mycoplasma*).
3. Нейробруцельоз;
4. Лайм-бореліоз;
5. Нейротуберкулез;
6. Лепра;
7. Ботулізм.

Властивості пріона як інфекційного агента

- ❖ здатний проходити через бактеріальні фільтри діаметром 25-100 нм;
- ❖ не росте на штучних поживних середовищах;
- ❖ викликає загибель заражених тварин;
- ❖ накопичується до титрів 10^5 - 10^{11} на 1 г мозкової тканини;
- ❖ репродукується в селезінці та ретикулоендотеліальній системі, а потім в мозковій тканині;
- ❖ здатний до адаптації до нового хазяїна з укороченням інкубаційного періоду;
- ❖ специфічне коло господарів;
- ❖ зміна патогенності і вірулентності у різних штамів для різного кола господарів;
- ❖ можлива персистенція в культурі клітин, отриманих з органів і тканин зараженого організму.



Варіант	Клінічний синдром	Причина	Патоморфологічні зміни	Клінічні прояви
Інфекційний	Ятрогенна ХКЯ	Інокуляція	Спонгіоформна енцефалопатія в корі головного мозку, мозочку, підкірковій сірій речовині. Амілоїдні бляшки, скупчення пріонів, внутрішньоклітинні відкладення в церебральній і мозочковій корі, зниження обсягу і маси головного мозку та атрофія його кори з атрофією базальних	Інкубаційний період до 10 років. Порушення зору, інтелекту, запаморочення, парестезії.
	Новий варіант ХКЯ (від 16 до 40 років).	Аліментарно		Починається у 50-65 років. Психічні порушення пам'яті, тривога, депресія, зміни поведінки, дизестезія обличчя і кінцівок, деменція, міоклонії або хорія.
	Спадкова ХКЯ	Вроджені сімейні мутації в гені PRNP,		

			ядер, таламуса і гіпоталамуса.	
	Синдром Герстманна-Штреуслера-Шейнкера	Сімейне успадкування. Мутація в кодонах.	Енцефалопатія з мультицентричними PrP бляшками, спонгіоформні зміни, атрофія провідникових систем спинного мозку та мозкового стовбура, а також підкіркових ядер.	Починається в 30-40 років і триває 5 років. Паралічі погляду, глухота і сліпота. Відсутність рефлексів на нижніх кінцівках, парепарез, емоційна слабкість; паркінсонізм.
Спорадичний	Хвороба Крейтцфельдта-Якоба	Мутація PRNP	Спонгіоформна енцефалопатія в корі головного мозку, мозочка, підкірковій сірій речовині, зменшення маси мозку, стоншення кори. Дегенерації нейронів і їх відростків, загибель нейронів і астроцитоз.	
Трансмісивний	Куру	Канібалізм	Тканини головного мозку деградує в губчасту масу. Прогресуюча дегенерація нервових клітин області, яка контролює рух тіла.	Інкубаційний період до 30 років. Безсоння, гіпертензія, гіпертермія, гіпергідроз, тахікардія, тремор, атаксія, гіпер-рефлексія, міоклонія, порушення уваги, пам'яті, дезорієнтація, галюцинації.
Спадковий	Фатальна сімейна інсомнія	Мутації PRNP	Атрофія ядер таламуса, олив, гліоз церебральної і мозочкової кори, відсутність бляшок.	Починається в 25-71 рік. Прогресуюче безсоння, гіпертензія, гіпертермія, гіпергідроз, тахікардією, тремор, атаксія, гіперрефлексія, міоклонія, порушення уваги, пам'яті, дезорієнтація, галюцинації.
	Різні атипові деменції		Спонгіоформна дегенерація сірої речовини головного мозку, атрофія і загибель нервових клітин, астроцитарний гліоз, амілоїдні бляшки з PrPSc.	

Методи діагностики пріонових інфекцій:

- Патоморфологічні методи;
- Імунохімічні методи;
- Західний блоттінг;
- ЕЕГ;
- Імуноцітохімічні дослідження для виявлення відкладень патологічної ізоформи пріонів білка (PrPSc) в гістологічних зрізах з різних ділянок мозку.

Найпростіші та гриби, яки викликають нейроінфекції:

1. *Toxoplasma gondii*;
2. *Cryptococcus neoformans*,
3. Гриби рода *Candida*;
4. *Coccidioides immitis*.

Практичне заняття №46

Тема: «Санітарна мікробіологія. Санітарно-мікробіологічні дослідження в аптеках»

Актуальність теми:

Мікроби повсюдно поширені в природі, яка нас оточує. Вони містяться в ґрунті, воді, повітрі, на рослинах, тваринах, харчових продуктах, предметах, в організмі людини і на поверхні її тіла.

Складні взаємовідносини мікроорганізмів з середовищем, яке обумовлює їх розмноження, розвиток та виживання, вивчає спеціальна біологічна наука – екологія.

Медична мікробіологія – вивчає патогенні мікроби в тісному зв'язку їх з зовнішнім середовищем. Вона встановлює взаємовідношення між різними видами мікробів, виявляє патогенез, шляхи передачі заразних хвороб і розробляє методи знешкодження заразного матеріалу.

Санітарна мікробіологія – розділ медичної мікробіології, яка вивчає мікроорганізми, які знаходяться в оточуючому середовищі і здатні проявляти негативний вплив на стан здоров'я людини. Вона розробляє мікробіологічні показники гігієнічного нормування, методи контролю за ефективністю знезаражування об'єктів оточуючого середовища, виявляє в об'єктах зовнішнього середовища патогенні, умовно-патогенні та санітарно-показові мікроорганізми.

Фармацевт повинен знати, які об'єкти в аптеці підлягають дослідженню. Вміти правильно здійснювати відбір зразків та проводити їх мікробіологічне дослідження, вірно оцінювати його результати.

Конкретні цілі:

- Тракувати поняття “санітарно-показові мікроорганізми та їх роль як індикатора при оцінці ступеня контамінації патогенними мікроорганізмами об'єктів бактеріологічного контролю в аптечних закладах, води, ґрунту та повітря.
- Запам'ятати які об'єкти в аптеці підлягають бактеріологічному контролю.
- Аналізувати якісний та кількісний склад мікробів води, ґрунту, повітря, об'єктів бактеріологічного контролю в аптеці і робити висновки про їх безпечність в епідемічному відношенні.
- Інтерпретувати санітарно-бактеріологічні критерії оцінки води, об'єктів довкілля, повітря закритих приміщень та лікарської сировини.

Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція). Дивитись практичне заняття №41.

Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент на занятті:

Термін	Визначення
Санітарна мікробіологія	Наука, яка вивчає мікрофлору навколишнього середовища (в тому числі патогенні бактерії та віруси) та процеси, які вони викликають, що може безпосередньо або побічно впливати на здоров'я людини, чи оточуюче середовище.
Задачі санітарної мікробіології	1. Розробка, удосконалення, оцінка мікробіологічних методів дослідження об'єктів навколишнього середовища – води, повітря, ґрунту. 2. Оцінка шляхів впливу людини і тварин на навколишнє середовище. 3. Розробка ГОСТів та інших нормативів, методичних вказівок. 4. Розробка рекомендацій та заходів по оздоровленню об'єктів навколишнього середовища та контроль за їх виконанням. 5. Охорона зовнішнього середовища.
Санітарно-показові мікроорганізми	Представників нормальної мікрофлори людини та тварин, виявлення яких в об'єктах зовнішнього середовища свідчить про фекальне або повітряно-крапельне забруднення їх виділеннями людини чи теплокровних тварин.
Вимоги до санітарно-показових мікроорганізмів	8. Вони повинні постійно знаходитися в виділеннях людини та теплокровних тварин і поступати в навколишнє середовище в великій кількості. 9. Вони не повинні мати іншого природного резервуару крім організму людини чи тварин. 10. Після потрапляння в навколишнє середовище, вони повинні зберігати життєздатність протягом строків близьких до строків виживання патогенних мікробів, виводимих із організму тими же шляхами. 11. Вони не повинні розмножуватись у довкіллі. 12. Вони не повинні змінювати свої біологічні властивості в об'єктах зовнішнього середовища. 13. Вони повинні бути достатньо типові, щоб їх диференціальна діагностика здійснювалась без особливих труднощів. 14. Індикація, ідентифікація та кількісний облік повинні проводитися сучасними, простими, доступними мікробіологічними методами.
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП)	До бактерій групи кишкових паличок (БГКП) відносяться грамнегативні, що не утворюють спор палички, які зброджують глюкозу з утворенням кислоти та газу при $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин і в яких відсутня оксидазна активність.

Загальне мікробне число води	Кількість мезофільних, мезотрофних аеробів і факультативних анаеробів, які виростають на МПА при 37°C протягом 24 год.
Колі-індекс	Кількість кишкових паличок в 1 л води
Мікробне число повітря	Кількість мікроорганізмів в 1 м ³ повітря
МАФAM	Мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми

Теоретичні питання до заняття:

- Значення санітарної мікробіології в діяльності фармацевта.
- Завдання і методи проведення мікробіологічних досліджень.
- Санітарно-показові мікроорганізми води, повітря, об'єктів довкілля.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води. Визначення мікробного числа. Визначення колі-індексу (методом мембранних фільтрів і бродильним).
- Роль води в передачі збудників інфекційних захворювань.
- Методи визначення мікробного числа повітря.
- Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря (седиментаційний та аспіраційний).
- Об'єкти санітарно-мікробіологічного контролю в аптеці.
- Методики визначення санітарно-мікробіологічного стану приміщень та обладнання аптек.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Створити схеми санітарно-бактеріологічного дослідження води, повітря, об'єктів довкілля.
- Здійснити облік результатів визначення колі-індексу і колі-титру води методом мембранних фільтрів.
- Здійснити облік результатів визначення загального мікробного числа і наявності санітарно-показових мікроорганізмів у повітрі.
- Вивчити апаратуру і поживні середовища, які використовують при санітарно-бактеріологічних дослідженнях об'єктів навколишнього середовища.

Зміст теми:

На практичному занятті студенти вивчають схеми санітарно-бактеріологічного дослідження води, повітря, ґрунту об'єктів довкілля. Здійснюють облік результатів визначення колі-індексу води методом мембранних фільтрів. Здійснюють облік результатів визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів повітря. Вивчають апаратуру і поживні середовища, які використовують при санітарно-бактеріологічних дослідженнях об'єктів навколишнього середовища. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.

Рекомендації для оформлення протоколу

Вода дистильована для приготування ЛЗ, крім ін'єкційних розчинів і очних крапель.

Проби відбирають з бюретки, заповненої досліджуваною водою; вивідний кінець якої попередньо обпалюють ватно-спиртовим факелом. Проби забирають в стерильні пляшки в обсязі 300 мл. Якщо результати виявляються незадовільними, то проби відбирають з приймача дистильатора. Визначають зміст МАФАМ, цвілевих і дріжджових грибів. Результати оцінюють за загальною кількістю мікроорганізмів шляхом підсумовування числа вирослих колоній бактерій і грибів. Гранично допустимий вміст 10-15 КУО в 1 см³. Наявність бактерій групи БГКП в дистильованій воді не допускається. Вода дистильована для приготування ін'єкційних розчинів і очних крапель. Відбір проб проводять у стерильні флакони в обсязі 15 ~ 20мл безпосередньо з тих ємностей, в яких здійснюють стерилізацію.

- Ін'єкційні розчини до стерилізації відбирають під час їх приготування, але не пізніше 1,5 год і доставляють в тих флаконах, в яких їх стерилізуватимуть.

- Ін'єкційні розчини, очні краплі після стерилізації і приготовані асептичним способом доставляють в аптечній упаковці.

- Очні краплі з торгового залу аптек доставляють в тих упаковках, в яких їх відпускають (3-4 найменування як зі столу асистента, так і з прилавка).

Дослідження сухих ЛЗ.

Проводять за показаннями, наприклад у разі неодноразових незадовільних бактеріологічних аналізів. Відбір проб проводять стерильними ложками в кількості 30-50 г, потім розчиняють стерильною дистильованою водою до концентрації, що використовується у відповідному розчині ін'єкцій та очних крапель.

Дослідження аптечного обладнання.

Посуд, пробки, прокладки, воронки, циліндри досліджують в момент підготовки до розливу ін'єкційних розчинів і очних крапель. Посуд відбирають в закритому вигляді, але без вмісту в кількості трьох штук однаковою ємності; пробки та ущільнювачі по п'ять штук, поміщаючи їх в стерильну закупорюються посуд. Дослідження проводять шляхом ополіскування обладнання 10 мл стерильної водопровідної води. У змивній рідині визначають МАФАМ і БГКП. Бактерій групи МАФАМ не повинно бути більше 150 КУО в змивах, з трьох флаконів, п'яти пробок і п'яти прокладок. Присутність БГКП не допускається.

Дослідження повітря.

Проби відбирають в асептичному блоці, стерилізаційної кімнаті, в асистентській, фасувальній, матеріальній, мийній, в залі обслуговування. Відбір проводять аспіраційним методом в чистому, підготовленому до роботи приміщенні (не раніше ніж через 30 хв після вологого прибирання приміщення), при закритих дверях і кватирках. Рівень відбору проб - висота робочого столу, швидкість протягування повітря - 25 л / хв. ОМЧ визначають в 100 л повітря, золотистий стафілокок - в 250 л, цвіль і дріжджі - в 250 л.

Інші об'єкти.

Санітарно-мікробіологічними дослідженнями також підлягає тара для зберігання аптечного обладнання, ступки, ваги, руки персоналу, рушники, спецодяг і робочі місця. Проводять дослідження на наявність БГКП, синьогнійної палички, протеїв і золотистого стафілокока (за показаннями). Проби беруть методом змиву за допомогою ватних тампонів, поміщених в пробірки з 2 мл 0,85% розчину NaCl або 0,1% пептонній воді. Проводять посів на рідкі та щільні живильні середовища. У досліджуваних зразках наявність бактерій групи БГКП, синьогнійної палички, протеїв і золотистого стафілокока не допускається.

Критерії оцінки санітарно-мікробіологічного стану повітря аптек.

Назва приміщення	Час дослідження	Загальна кількість колоній мікроорганізмів в 1 м ³ повітря	Кількість золотистого стафілокока в 1 м ³ повітря	Кількість цвільових і дріжджових грибів в 1 м ³ повітря
Асептичний блок	До роботи	Не більше 500	Не повинно бути в 250 л	Не повинно бути в 250 л
Стерилізаційна (чиста половина)	Після роботи	Не більше 1000	Не повинно бути в 250 л	Не повинно бути в 250 л
Асистентська, фасувальна, дефектарна, матеріальна	До роботи	Не більше 750	Не повинно бути в 250 л	Не повинно бути в 250 л
	Після роботи	Не більше 1000	Не повинно бути в 250 л	Не повинно бути в 250 л
Мийка	Під час роботи	Не більше 1000	Не повинно бути в 250 л	До 12
Зал обслуговування	Під час роботи	Не більше 1500	До 100	До 20

1. Результати визначення мікробного числа води. Для цього студенти одержують чашки МПА з засіяними об'ємами води, підраховують кількість колоній, що вирости у кожній чашці, ділять на об'єм води в мл, засіяної в чашку, враховують ступінь її розведення, вираховують середню арифметичну величину. Роблять висновок.

2. Результати визначення колі-індексу води методом мембранних фільтрів. Студенти підраховують кількість колоній (малинових), які вирости на фільтрах, визначають оксидазний тест. Колі-індекс вираховують таким чином: кількість бактерій групи кишкових паличок після фільтрації певного об'єму води помножують на 1000 і ділять на об'єм води після фільтрації.

3. Результати визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів повітря за методом Кротова. Студенти підраховують загальну

кількість колоній на кров'яному агарі і кількість гемаглютинуючих стафілококів та стрептококів. Оцінку чистоти повітря проводять, користуючись таблицями Шафіра або Чистовича.

Питання для самоконтролю студентів.

- Що вивчає санітарна мікробіологія?
- Значення санітарної мікробіології в діяльності фармацевта.
- Що підлягає санітарно-мікробіологічному обстеженню в аптеках, на підприємствах фармацевтичної промисловості?
- Санітарно-показові мікроорганізми води, повітря, об'єктів довкілля.
- Які вимоги висувають до мікрофлори зовнішнього середовища та об'єктів аптек, досліджуваних методом змивів?
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води.
- Визначення кількості бактерій-показників фекального забруднення: колі-індексу і колі-титру (методом мембранних фільтрів і бродильним).
- Які вимоги висувають до мікробіологічної чистоти аптечного посуду, допоміжного матеріалу (пробок, воронок, колбам, піпетка, марлеві серветки, фільтрувальному паперу і т.д.)?
- Методи визначення мікробного числа повітря.
- Методи санітарно-бактеріологічного дослідження повітря (седиментаційний та аспіраційний).
- Оцінка санітарного стану закритих приміщень за загальним мікробним обсіменінням, наявністю стафілококів, α - і β -гемолітичних стрептококів.
- Патогенні мікроорганізми, які визначають в об'єктах довкілля. Методи санітарно-мікробіологічного дослідження об'єктів довкілля.

Практичне заняття №47

Тема: «Мікробіологічні дослідження стерильних і нестерильних лікарських засобів»

Актуальність теми:

Санітарна мікробіологія – розділ медичної мікробіології, яка вивчає мікроорганізми, які знаходяться в оточуючому середовищі і здатні проявляти негативний вплив на стан здоров'я людини. Вона розробляє мікробіологічні показники гігієнічного нормування, методи контролю за ефективністю знезаражування об'єктів оточуючого середовища, виявляє в об'єктах зовнішнього середовища патогенні, умовно-патогенні та санітарно-показові мікроорганізми.

Фармацевт повинен знати вимоги до мікробіологічної чистоти лікарських засобів та мікробіологічні показники, які підлягають контролю. Вміти правильно здійснювати відбір зразків. Володіти методами визначення цих показників та вміти правильно інтерпретувати результати.

Конкретні цілі:

- Засвоїти методики які використовуються для контролю мікробної забрудненості стерильних та нестерильних лікарських форм.
- Інтерпретувати показники отримані при мікробіологічному дослідженні нестерильних лікарських засобів та лікарської сировини.

Базовий рівень підготовки. Дивитись практичне заняття №41.

Перелік основних термін, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

Термін	Визначення
Санітарна мікробіологія	Наука, яка вивчає мікрофлору навколишнього середовища (в тому числі патогенні бактерії та віруси) та процеси, які вони викликають, що може безпосередньо або побічно впливати на здоров'я людини, чи оточуюче середовище.
Задачі санітарної мікробіології	1. Розробка, удосконалення, оцінка мікробіологічних методів дослідження об'єктів навколишнього середовища – води, повітря, ґрунту. 2. Оцінка шляхів впливу людини і тварин на навколишнє середовище. 3. Розробка ГОСТів та інших нормативів, методичних вказівок. 4. Розробка рекомендацій та заходів по оздоровленню об'єктів навколишнього середовища та контроль за їх виконанням. 5. Охорона зовнішнього середовища.
Санітарно-показові	Представники нормальної мікрофлори людини та тварин, виявлення яких в об'єктах зовнішнього середовища свідчить

(індикаторними) мікроорганізми	про фекальне або повітряно-крапельне забруднення їх виділеннями людини чи теплокровних тварин.
Вимоги до санітарно-показових мікроорганізмів	1. Вони повинні постійно знаходитися в виділеннях людини та теплокровних тварин і поступати в навколишнє середовище в великій кількості. 2. Вони не повинні мати іншого природного резервуару крім організму людини чи тварин. 3. Після потрапляння в навколишнє середовище, вони повинні зберігати життєздатність протягом строків близьких до строків виживання патогенних мікробів, виводимих із організму тими же шляхами. 4. Вони не повинні розмножуватись у навколишньому середовищі. 5. Вони не повинні змінювати свої біологічні властивості в об'єктах зовнішнього середовища. 6. Вони повинні бути достатньо типові, щоб їх диференціальна діагностика здійснювалась без особливих труднощів. 7. Індикація, ідентифікація та кількісний облік повинні проводитися сучасними, простими, доступними мікробіологічними методами.
МАФАМ	Мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми

Теоретичні питання до заняття:

- Значення санітарної мікробіології в діяльності фармацевта.
- Методи випробовування лікарських засобів на стерильність.
- Методи дослідження нестерильних лікарських засобів.
- Мікроорганізми які визначаються у нестерильних лікарських засобах та лікарській сировині.
- Вимоги до мікробіологічних показників лікарських засобів.

Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

- Ознайомитись з вимогами до мікробіологічної чистоти лікарських засобів та занотувати в протокол основні показники, що використовуються для її оцінки
- Вивчити схеми санітарно-бактеріологічного дослідження стерильних та нестерильних лікарських засобів. Схеми досліджень занотувати в протокол.
- Здійснити облік результатів випробовування лікарського засобу на стерильність

Рекомендації до оформлення протоколу

Відповідно за вимогами до мікробіологічної чистоти поділяють 4 категорії лікарських засобів.

Випробування на стерильність проводять для контролю субстанцій, готових лікарських засобів або виробів, які згідно вимог мають бути стерильними. Ці лікарські засоби відносяться до 1 категорії.

Випробування проводять в асептичних умовах, попереджують мікробну контамінацію, але не мають впливу на мікроорганізми, що можуть бути виявлені в результаті випробування. Для досліджень використовують тіогліколеве середовище та соєво – казеїнове середовище. Основними методами, які використовуються для контролю, є метод мембранної фільтрації та метод прямого посіву, паралельно з якими обов'язково проводиться контрольний дослід з завідомо стерильними зразками. Метод мембранної фільтрації застосовується у всіх випадках, коли природа лікарського засобу це дозволяє - для випробування лікарських засобів у вигляді водних розчинів, що піддаються фільтрації, що змішуються або розчиняються у водних розчинниках або оліях, які не мають протимікробної активності за умов випробування. Використовують мембранні фільтри з діаметром пор не більше 0,45 мкм, здатні ефективно затримувати мікроорганізми. Діаметр фільтрів становить близько 50 мм. Фільтраційну установку і мембранні фільтри стерилізують і вносять зразок у кількості, передбаченій для даної форми лікарського засобу.

Тип лікарського засобу	Кількість засобу в одному контейнері	Мінімальна кількість зразку на дослідження
Парентеральні лікарські засоби	Рідина: Менше 1 мл 1 мл і більше	Увесь вміст кожного контейнера Половина вмісту кожного контейнера, але не більше 20 мл
	Порошки: Менше 50мг 50 мг і більш, але не більше 300мг 300мг і більше	Увесь вміст кожного контейнера Половина вмісту кожного контейнера 150 мг
Офтальмологічні та інші лікарські засоби	Водні розчини	Увесь вміст кожного контейнера але не менше 2,5 мл
	Інші готові лікарські засоби, розчинні у воді або ізопропілміристаті	Увесь вміст кожного контейнера але не менше 0,25 г
	Нерозчинні готові лікарські засоби, креми та мазі, що піддаються суспендуванню або емульгуванню	Увесь вміст кожного контейнера але не менше 0,25 г
Кетгут та інші шовні матеріали		Три відрізки нтки (по 30 см кожний)

Посіви інкубують протягом 14 діб при температурі від 30 до 35 С для середовищ, що призначені для виявлення бактерій та 20 - 25 С для виявлення грибів.

При використанні методу прямого посіву випробовуваний лікарський засіб вносять безпосередньо у поживне середовище в кількості, зазначеній у таблиці, кількість лікарського засобу не має бути більшим 10 % за об'ємом від кількості поживного середовища. У випадку, коли лікарський засіб володіє антимікробною активністю, її нейтралізують додаванням нейтралізаторів або збільшенням об'єму поживного середовища. Час інкубації та температура такі самі, як і для методу фільтрації. Посіви переглядають кілька разів у період інкубації, відмічаючи наявність або відсутність візуально видимого росту. Якщо випробовуваний зразок викликає помутніння поживного середовища, що унеможливорює облік, то за 14 діб інкубації переносять певну кількість середовища в посудину з тим самим середовищем і продовжують інкубацію вихідних та нових посівів, загальний час інкубації має становити не менше 14+7 діб від початку інкубування. Лікарський засіб вважається таким, що витримав випробування на стерильність, якщо при візуальному обліку не виявляється ріст мікроорганізмів.

Випробовування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів.

Нестерильні лікарські засоби згідно ДФУ входять до 2, 3, 4 категорії.

У нестерильних лікарських засобах визначають: загальну кількість мезофільних бактерій та грибів, що здатні рости за аеробних умов, а також загальне число життєздатних мікроорганізмів (мезофільних бактерій та грибів); наявність *E.coli* та сальмонел, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*.

Випробування проводять за умов, що дозволяють запобігти випадковому забрудненню досліджуваного зразку. Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів проводять методом мембранної фільтрації або методом посіву на чашки Петрі. Для визначення загального мікробного числа використовують 3 методи (мембранну фільтрацію, прямий висів, метод найбільш ймовірного числа). Для визначення мезофільних бактерій використовують м'ясо – пептонний агар, для визначення грибів – середовище Сабуро. Час інкубування посівів складає 5 діб. Температура інкубування для бактерій – 30° С, для грибів 25° – 30° С. Метод найбільш ймовірного числа використовують лише за неможливості використати інші методи.

Вимоги до лікарських засобів 2 категорії

Мікробіологічний показник	Допустима кількість
Загальне число життєздатних мікроорганізмів (бактерій та грибів разом) в 1г, 1 мл або на один пластир	Не більше 10 ² КУО
Ентеробактерії в 1г, 1 мл або на один пластир	Відсутність
<i>Ps. aeruginosa</i> в 1г, 1 мл або на один пластир	Відсутність
<i>S. aureus</i> в 1г, 1 мл або на один пластир	Відсутність

Вимоги до лікарських засобів 3 категорії

Мікробіологічний показник	А – засоби для орального та ректального застосування	В – засоби для орального застосування для яких попередня обробка неможлива
Загальне число життєздатних мікроорганізмів в 1г або 1 мл:		
бактерій	Не більше 10^3	Не більше 10^4
грибів	Не більше 10^2	Не більше 10^2
Ентеробактерії	Відсутність	Не більше 10^2
Кишкові палички		Відсутність
Сальмонели		Відсутність в 10г або 10мл
<i>Ps. aeruginosa</i>	Відсутність	Відсутність
<i>S. aureus</i>	Відсутність	Відсутність

Здійснюють облік результатів визначення мікробного числа і санітарно-показових мікроорганізмів у нестерильному лікарському засобі. Вивчають апаратуру і поживні середовища, які використовують при санітарно-бактеріологічних дослідженнях лікарських засобів. Виконані завдання студенти записують у протокол та підписують його у викладача.



Питання для самоконтролю студентів.

- Що вивчає санітарна мікробіологія?
- Значення санітарної мікробіології в діяльності фармацевта.

- Що підлягає санітарно-мікробіологічному обстеженню в аптеках, на підприємствах фармацевтичної промисловості?
- Санітарно-показові мікроорганізми які визначаються у нестерильних лікарських засобах.
- Методи санітарно-мікробіологічного дослідження лікарських засобів.
- Методи визначення загального мікробного числа у нестерильних лікарських засобах (мембранна фільтрація, прямий висів, метод найбільш ймовірного числа).
- Які вимоги висувають до мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів в залежності від його категорії.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. /Широбоков В.П., Клімнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.] –Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
2. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.], - Вінниця: Нова книга, 2018.- 576 с.
3. Широбоков В.П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология:ученик для студ. Высш. Мед. учеб. Заведений: перевод с укр.. издания / [Адрианова Т.В., Бобырь В.В., Виноград Н.А. и др..], - Винница. – Новая Книга, 2015. – 856 с. : ил.
4. Широбоков В.П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. навч. закл. / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011, 952 с. : іл.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. (За редакцією В.П.Широбокова). Вінниця: »Нова Книга», 2010. 447 – 451, 912 с.
6. Янковский Д.С., Широбоков В.П., Дымент Г.С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. К: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2011. 169 с.
7. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П. Медицинская и санитарная микробиология. М., 2006.
8. Поздеев О.А. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И.Покровского. – 4-е изд. испр. – М: ГЭОТАР – Медиа, 2006.
9. Медицинская микробиология, вірусологія и иммунология. Под ред. А.А.Воробьева, М., 2004, с. 354-356.
10. Климнюк С. І, Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. – Практична мікробіологія.-Тернопіль, „Укрмедкнига”, 2004, с. 190-194.

Додаткова:

1. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. – 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
2. W.Levinson, E.Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw-Hill Companies, 2000, 582 p.