

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОМИТЕТ ГОСУДАРСТВЕННОГО САНИТАРНО-
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

РЕСПУБЛИКАНСКАЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ
СТАНЦИЯ

«Согласовано»

Начальник Управления
медицинского образования и
науки

_____ Ж.Баттакова

« 03 » марта 2009 г.

«Утверждаю»

директор Департамента
науки и человеческих ресурсов

_____ Н.Хамзина

« 03 » марта 2009 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КИШЕЧНЫХ ПРОСТЕЙШИХ
(методические рекомендации)

Астана 2009 год

В методических рекомендациях изложены основные методы лабораторной диагностики кишечных протозоозов.

Методические рекомендации предназначены для практических врачей всех специальностей, лаборантов, студентов высших медицинских учебных заведений.

Составители: Шапиева Ж.Ж.- кандидат биологических наук, заведующая отделом эпидемиологии паразитарных заболеваний Республиканской санитарно-эпидемиологической станции, Тастанова С.С. - врач-лаборант.

Главный врач Республиканской санитарно-эпидемиологической станции, доктор медицинских наук Оспанов К.С.

Рецензенты:

- Даутбаева К.А., кандидат биологических наук, профессор, Казахский национальный университет им. аль-Фараби.

- Мукашев Ж.К., кандидат медицинских наук, доцент, Алматинский государственный институт усовершенствования врачей.

Введение

Заболевания, вызываемые простейшими (Protozoa), протозоозы, имеют широкое распространение. В организме человека могут жить и размножаться около 30 видов простейших, ряд из них вызывают тяжелые заболевания: малярию, лейшманиозы, лямблиоз, амебиаз, токсоплазмоз, балантидиаз, пневмоцистоз, трипаносомоз, трихомониаз и т.д. Они паразитируют в самых различных органах и тканях человека: в крови, кишечнике, центральной нервной системе.

В республике ежегодно регистрируется значительное число больных кишечными протозоозами, в основном лямблиозом (показатель заболеваемости в 2005г. – 53,9 на 100 тыс.нас , 2006г. - 53,1). Часто кишечные протозоозы протекают без ярких специфических симптомов, что усложняет их клиническую диагностику. Постановка диагноза возможна только с помощью лабораторных исследований. Однако, на сегодня доступной учебной и методической литературы по диагностике протозоозов не достаточно.

В настоящих методических рекомендациях представлены основные копроовоскопические методы лабораторной диагностики кишечных простейших: амеб, лямблей, криптоспоридий, балантидий, кокцидий доступные для практического здравоохранения.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Простейшие составляют подцарство одноклеточных эукариотических организмов – *Protozoa*. Тело их состоит из одной клетки, функционирующей как полноценный самостоятельный организм благодаря наличию в ней специальных органоидов (органелл), которые выполняют отдельные функции, соответствующие функциям и тканям многоклеточных животных. Клетка простейшего организма ограничена наружной мембраной. У большинства видов под мембраной имеется плотная эластичная оболочка – пелликула. Иногда пелликула отсутствует и ее функции выполняет более плотный гомогенный поверхностный слой цитоплазмы – эктоплазма, окружающая более жидкую и зернистую эндоплазму. У ряда других видов простейших, кроме пелликулы, формируется более толстая наружная оболочка, выполняющая защитную и опорную функции. В эндоплазме расположено ядро (или несколько ядер), клеточные органоиды (рибосомы, эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, митохондрии и др.), а также некоторые специальные органоиды и включения. Клетки простейших имеют размеры от 3 мкм до 3 мм (в среднем 50-150 мкм). В большинстве случаев форма их тела асимметричная, некоторые, имеющие более плотную скелетную структуру, построены по радиально-лучевой, спиральной или двусторонней симметрии. Размножаются простейшие путем простого или множественного деления, а также почкованием или цистообразованием. Биологический цикл многих простейших включает две жизненные формы: активную, или вегетативную форму, которая называется *трофозоитом*, и покоящуюся, резистентную форму, называемую *цистой*.

У человека простейшие паразитируют в желудочно-кишечном тракте, в крови и тканях различных органов. Простейшие оказывают как местное, так и общее патогенное действие на организм человека.

Классификация простейших

КЛАСС Sarcodina - Саркодовые
 ПОДКЛАСС Rhizopoda – корненожки
 Отряд Testacea
 Отряд Foraminifera
 Отряд Amoebida
 ПОДКЛАСС Radiolaria
 ПОДКЛАСС Heliozoa

Entamoeba histolitica
 E. hertmanii
 E. gingivalis
 E.coli
 Jodamoeba buetschlii

Endolimax nana
Dientamoeba fragilis

КЛАСС Mastigophora – жгутиковые
Отряд Kinetoplastida
Семейство Trypanosomatidae
Род Leishmania
Род Trypanosoma
Отряд Trichomonadina
Семейство Trichomonadidae
Отряд Diplomonadina

КЛАСС Sporozoa – споровики
Отряд Coccidiida
Подотряд Eimeriidea
Подотряд Haemosporidia
Семейство Plasmodidae
КЛАСС Ciliata (Infusoria) - ресничные
Balantidium coli

Класс Саркодовые (Sarcodina)

Представители класса саркодовых (Sarcodina) – самые примитивные простейшие. Форма их тела непостоянна. Передвигаются они с помощью ложноножек. Обитают в пресноводных водах, в почве, в морях.

Медицинское значение имеют представители отряда амёб *Amoebina*. Паразитические амёбы обитают у человека в основном в пищеварительной системе. Некоторые саркодовые, ведущие свободный образ жизни и обитающие в почве и загрязнённой воде, при попадании в организм человека могут вызывать тяжёлые заболевания, нередко заканчивающиеся смертью.

Класс Жгутиковые (Mastigophora)

Тело жгутиковых, кроме цитоплазматической мембраны покрыто ещё и пелликулой - специальной оболочкой, обеспечивающей постоянство их формы. Имеется один или несколько жгутиков, органелл движения, представляющих собой нитевидные выросты эктоплазмы. Внутри жгутиков проходят фибриллы из сократительных белков. Некоторые жгутиковые имеют также ундулирующую мембрану – своеобразную органеллу передвижения, в основе которой лежит тот же жгутик, не выступающий свободно за пределы клетки, а проходящий по наружному краю длинного уплощённого выроста цитоплазмы. Жгутик приводит ундулирующую мембрану в волнообразное движение. Основание жгутика всегда связано с кинетосомой – органеллой, выполняющей энергетические функции. Ряд жгутиковых имеет также и опорную органеллу – аксостиль – в виде плотного тяжа, проходящего внутри клетки. Разные виды паразитических жгутиковых у человека обитают в различных органах. Циклы их развития очень разнообразны.

Инфузории (Infusoria)

Для инфузорий свойственны постоянная форма тела и наличие пелликулы. Органеллы передвижения – многочисленные реснички, покрывающие всё тело и представляющие собой полимеризованные жгутики. У инфузорий обычно 2 ядра: крупное – макронуклеус, регулирующее обмен веществ, и малое – микронуклеус, служащее для обмена наследственной информацией при конъюгации. Сложно организован аппарат пищеварения. Имеется постоянное образование: цитостом – клеточный рот, цитофаринкс – клеточная глотка. Пищеварительные вакуоли перемещаются по эндоплазме, при этом литические ферменты выделяются поэтапно. Это обеспечивает полноценное переваривание пищевых частиц. Непереваренные остатки пищи выбрасываются через порошицу – специализированный участок клеточной поверхности.

У человека паразитирует единственная инфузория – балантидий, которая обитает в пищеварительной системе.

Споровики (Sporozoa)

Все споровики – паразиты и комменсалы* животных и человека.

Органеллы движения у них отсутствуют. Питание споровиков осуществляется за счёт поглощения пищи всей поверхностью тела. Многие споровики внутриклеточные паразиты.

Характерны два варианта циклов развития споровиков:

Первый вариант включает стадии бесполого размножения: полового процесса в виде копуляции и спорогонии. Бесполое размножение осуществляется путём простого и множественного деления – шизогонии. Половому процессу предшествует образование половых клеток – мужских и женских гамет. Гаметы сливаются, а образовавшаяся зигота покрывается оболочкой, под которой происходит спорогония – множественное деление с образованием спорозоитов. Споровики с таким типом жизненного цикла обитают в тканях внутренней среды.

Второй вариант встречается у споровиков, обитающих в полостных органах, сообщающихся с внешней средой. Он очень прост и включает стадии цисты и трофозоида.

* Комменсализм – форма симбиоза, при которой один вид использует остатки или излишки пищи другого, не причиняя видимого вреда, но и не принося пользы.

У человека паразитирует 7 видов амёб. Все они связаны с пищеварительной системой и поселяются в различных ее отделах.

Амеба ротовая или десневая (*E. gingivalis*). Размеры трофозоитов ротовой амебы составляют от 5 до 35 мкм в диаметре (в среднем 10-12 мкм). Цитоплазма состоит из светлой зоны – эктоплазмы и гранулированной, сильно вакуолизированной эндоплазмы. В пищеварительных вакуолях находятся бактерии, грибки, эпителиальные клетки и ядра поглощенных амебами лейкоцитов, которые при переваривании образуют так называемые слюнные тельца, интенсивно окрашивающиеся железным гемотоксилином по Гейденгайну. После окраски эти тельца напоминают эритроциты. В действительности *E. gingivalis* эритроциты, как правило, не заглатывают. Ротовые амебы обычно образуют много псевдоподий, более широких, чем у дизентерийных амёб. Движение часто поступательное, напоминает движение *Entamoeba histolytica*, но более медленное. Размеры ядра 1,7-6,7 мкм. При окраске по Гейденгайну в нем видна маленькая эндосома, от которой к ядерной мембране тянутся несколько ахроматиновых нитей. Периферический хроматин расположен под ядерной оболочкой в виде отдельных глыбок, не одинаковых по форме и величине. Размножение происходит бинарным делением. Ротовые амебы, являясь комменсалами, локализуются в ротовой полости между зубами, в десневых карманах и кариозных полостях зубов. Они могут способствовать усиленному отложению зубного камня.

Амеба кишечная (*Entamoeba coli*). Размер вегетативной формы 20-40 мкм. В цитоплазме в отличие от большой вегетивной формы дизентерийной амебы содержатся микроорганизмы, грибы, пищевые частицы, но отсутствуют эритроциты. Разделение на экто- и эндоплазму можно наблюдать только при образовании ложноножек или у погибших амёб. Ядро у живых амёб хорошо видно, что также служит отличием от дизентерийной амебы, и имеет вид кольцевидного образования, состоящего из блестящих зерен хроматина. Цисты крупные, с резко очерченной оболочкой, восьмиядерные. Нередко встречаются незрелые двуядерные цисты, гликогеновая вакуоль крупная. Цисты кишечной амебы обычно крупнее цист дизентерийной амебы (15-30 мкм). Цисты кишечной амебы имеют 8 ядер с периферическим хроматином неправильной формы и эксцентрично расположенными кариосомами. Ядра расположены на разных уровнях, чтобы увидеть и подсчитать их количество, следует тщательно фокусировать микроскоп, вращая микровинт в разных направлениях.

Если обнаруживаются незрелые цисты кишечной амебы, их следует дифференцировать с цистами дизентерийной амебы. Чаще других встречаются незрелые цисты с 2 ядрами (цисты кишечной амебы с 1 ядром встречаются редко), с крупной глыбкой гликогена и несколькими мелкими хроматоидными глыбками. Определение точных размеров помогает дифференцировать цисты кишечной амебы от цист дизентерийной амебы.

Кишечные амёбы распространены повсеместно. Они обнаруживаются одинаково часто как в стуле здоровых лиц, так и у пациентов, страдающих кишечными заболеваниями.

Амеба дизентерийная (*Entamoeba histolytica*) может существовать в трех формах: большая вегетативная, малая вегетативная, цистная. Большая вегетативная форма имеет диаметр 20-30 мкм, при активном движении вытягивается и достигает длины до 60-80 мкм. Цистная форма диаметром 7-18 мкм имеет от 1 до 4 ядер, устойчива во внешней среде. Диаметр цист дизентерийной амебы колеблется от 10 до 15 мкм. Зрелые цисты дизентерийной амебы имеют 4 ядра с равномерно расположенным периферическим ядерным хроматином и центральной кариосомой. Обычно ядра расположены на разных уровнях, поэтому необходимо фокусировать микроскоп на разную глубину для того, чтобы увидеть все 4 ядра. Необходимо плавно поднимать объектив до того момента, когда циста начнет выходить из фокуса.

Вместе с незрелыми цистами, следует искать и зрелые формы, чтобы идентифицировать их вид. Если обнаруживаются цисты с 5 или большим количеством ядер, то они являются цистами кишечной амебы

Амеба Гартманна (*Entamoeba hartmanni*) весьма сходна с просветной формой дизентерийной амебы. Отличается от нее более мелкими размерами трофозоитов (5-12 мкм, в среднем 8 мкм) и цист (5-10 мкм, в среднем 7,5 мкм). Ядро мелкое, около 2,5 мкм в диаметре. Встречаются двуядерные особи. Ядро по строению сходно с ядром *Entamoeba histolytica* и также не видно без окраски. У амеб в покое состоянии разграничение на экто- и эндоплазму отсутствует. Движение, как и у дизентерийной амебы, активное, происходит путем образования прозрачных эктоплазматических псевдоподий. Цисты правильной округлой формы, размером 5-7 мкм. Число ядер и их строение такое же, как в цистах дизентерийной амебы. В незрелых одно- и двуядерных цистах обнаруживаются гликогеновые вакуоли. Железным гематоксилином цисты *E. hartmanni* окрашиваются более интенсивно, чем цисты дизентерийной амебы. Они чаще и в значительно большем количестве, чем дизентерийные амебы, содержат окрашенные в черный цвет палочковидные, хроматоидные тельца с округленными концами. Обилие их иногда затрудняет определение числа ядер и их структуры. Обычно *E. hartmanni* дифференцируют микроскопически по размерам трофозоитов и цист. Амеба Гартманна обитает в содержимом толстого кишечника (от слепой до прямой кишки); непатогенна, питается бактериями. В ткани хозяина не проникает. Эритроциты не фагоцитирует. Обнаруживается в среднем у 2-3% обследованных.

Иодамеба Бючли (*Jodamoeba buetschlii*) Размеры трофозоитов от 6 до 23 мкм (в среднем 8-13 мкм). У покоящейся амебы разделение на экто- и эндоплазму неразлично. В движении тело амебы вытягивается. В эндоплазме содержится много пищевых частиц: бактерий, грибов и др. На окрашенных препаратах видно пузырьковидное ядро диаметром 3-5 мкм, которое содержит крупную центрально расположенную эндосому. Ядерная оболочка обычно свободна от зерен периферического хроматина и поэтому слабо заметна. От

эндосомы к ядерной оболочке тянутся несколько ахроматиновых нитей структуры. Цисты обычно неправильной продолговатой формы диаметром 5-20 (чаще 8-12) мкм, содержат одно ядро, которое расположено чаще на периферии цисты, иногда пристеночно. Внутри ядра находится крупная компактная эндосома (ядрышко). Находящиеся в ней гранулы образуют на одной из ее сторон компактную массу, вследствие чего эндосома кажется смещенной в сторону. В цитоплазме всех без исключения цист имеется крупная гликогеновая вакуоль, окрашивающаяся жидкостью Люголя в бурый цвет. Хроматиновые тельца в цистах отсутствуют. *Jodamoeba butschlii* распространены повсеместно. Локализуются в толстом отделе кишечника (слепая и поперечно-ободочная кишки). Вид считается непатогенным, однако имеются отдельные сообщения о случаях хронических колитов, клинически сходных с амебиазом, при которых в кале больных обнаруживалось большое количество йодамеб.

Карликовая амеба (*Endolimax nana*) – самая маленькая из амieb человека, обитающих в толстой кишке. Размеры трофозоитов от 5 до 14 мкм (в среднем 7 мкм). Цитоплазма не дифференцирована на экто- и эндоплазму, вакуолизирована и обычно содержит значительное число мелких бактерий. По характеру движений и образованию псевдоподий карликовая амеба напоминает дизентерийную. Ядро сферическое, около 2 мкм в диаметре, видно лишь на окрашенных препаратах. Эндосома крупная, компактная, окружена светлой зоной, благодаря чему ядро имеет вид «глазка». Цисты чаще овальной формы, длина их варьирует от 5 до 14 мкм (в среднем 8-10 мкм). Встречаются незрелые одно-, двуядерные и зрелые – четырехядерные цисты. В окрашенных препаратах внутри ядер хорошо заметны крупные, интенсивно окрашенные эндосомы, прилегающие к слабо заметной ядерной оболочке. Благодаря этому ядра, как и у трофозоитов, имеют вид «глазков». Хроматоидных телец цисты не содержат. Карликовая амеба обитает в содержимом толстого отдела кишечника. Эритроцитов не фагоцитирует. Распространение повсеместно. До настоящего времени ее патогенность не доказана.

Диентамеба (*Dientamoeba fragilis*) - сравнительно небольшая амеба, обитающая в просвете толстой кишки, где питается бактериями. Размеры тела 5-8 мкм, экто- и эндоплазма хорошо различимы. Движение осуществляется посредством листовидных или зубчатых по краям конусовидных псевдоподий. Большинство особей двуядерные. Оба ядра одинаковой величины, размером 0,8-2,3 мкм, с центральной кариосомой, состоящей из 4-8 отдельных круглых или овальных хроматоидных зернышек. Ядра видны только после окрашивания. Патогенность этих амieb недостаточна изучена. Их находят только в жидком стуле, обычно при кишечных расстройствах.

Лямблии (*Lambliа intestinalis*) существуют в виде вегетативной формы (трофозоит) и способны образовывать цисты. Вегетативная форма активная, подвижная, грушевидной формы. Передний конец тела закруглен, задний – заострен, длина 9-18 мкм (приложение 4, рис.1 к настоящим методическим рекомендациям).

В передней части тела находится присасывательный диск в виде углубления. Имеет 2 ядра, 4 пары жгутиков. Жгутики, проходя частично в цитоплазме, образуют два хорошо видимых при окраске продольных пучка. Движение характерное, паразит все время переворачивается боком за счет вращательного движения вокруг продольной оси. Пищу всасывают всей поверхностью тела. Размножаются путем продольного деления. В препарате при комнатной температуре лямблии быстро погибают.

Цисты – неподвижные формы лямблии, длина 10-14 мкм, форма овальная, оболочка сравнительно толстая, хорошо очерчена, часто в значительной своей части как бы отслоена от тела самой цисты (приложение 4 к настоящим методическим рекомендациям). Этот признак помогает отличить цисту от других сходных образований.

Лямблии обитают в верхнем отделе тонкого кишечника. С помощью присасывательного диска прикрепляются к ворсинкам. В желчном пузыре лямблии не живут, так как желчь на них действует губительно. Частое их обнаружение при дуоденальном зондировании объясняется тем, что лямблии попадают в содержимое со стенок двенадцатиперстной кишки. Вегетативные формы с испражнениями не выделяются, однако при поносах их можно обнаружить в свежесделанных жидких фекалиях. Лямблии, попадая в нижние отделы кишечника, где условия для них неблагоприятные, превращаются в цисты, которые и выделяются с испражнениями.

Цисты хорошо сохраняются в окружающей среде, в зависимости от влажности и температуры воздуха – до месяца. При высушивании погибают очень быстро.

Заражение может произойти через загрязненные руки, игрушки, пищу и воду. Цисты, попадая в кишечник, превращаются там в вегетативные формы. Одна циста образует две вегетативные формы. Движение вегетативных форм простейших является одним из самых характерных и отличительных их свойств которое позволяет установить правильный диагноз (4).

Балантидий (*Balantidium coli*) – самый крупный представитель паразитических простейших человека. С помощью многочисленных ресничек балантидии активно двигаются, нередко вращаясь при этом вокруг своей оси. Питаются различными пищевыми частицами, включая бактерии, грибы, форменные элементы крови, для заглатывания которых служит цитостом (клеточный рот).

Цитоплазма балантидий содержит пищеварительные и две пульсирующие выделительные вакуоли. Ядро (макронуклеус, или большое ядро, так как имеется еще и ядрышко, или микронуклеус) у живых представителей иногда видно и без окраски в виде светового пузырька бобовидной формы.

Балантидии имеют стадии трофозоида и цисты (приложение 4, рис.2 к настоящим методическим рекомендациям). Трофозоиды имеют крупные размеры (50-200 мкм в длину и 40-70 мкм в ширину), очень подвижны, их легко можно увидеть в препаратах с физиологическим раствором под малым увеличением. Они покрыты короткими волосками (ресничками), благодаря частой пульсации которых балантидии быстро передвигаются. Балантидии

очень скоро погибают во внешней среде, поэтому пробы фекалий должны быть исследованы в течение 1 часа после дефекации.

Диаметр цист колеблется от 45 до 75 мкм. Трофозоиты и цисты балантидий плохо окрашиваются йодом или методами постоянной окраски. Поэтому приемлемым методом их исследования является метод нативного препарата с физиологическим раствором (1,5)

Криптоспоридии (*Cryptosporidium spp*) – важнейший представитель кокцидий кишечника. Возбудитель криптоспориоза человека - *Cryptosporidium parvum*. Часто вызывают диарею у детей младше 5-летнего возраста. Криптоспоридии развиваются между ворсинками энтероцита, проходя последовательно бесполое и половое размножение. Образовавшиеся ооцисты выделяются с фекалиями. Они мелкие (5-6 мкм в диаметре), могут быть легко приняты за круглые дрожжи. При окраске по Циль-Нильсену ооцисты криптоспоридий окрашиваются в малиновый цвет.

Кокцидии (*Isospora belli*). Развитие кокцидий, бесполое и половое, происходит в эпителиальных клетках слизистой оболочки тонкого кишечника. С испражнениями зараженного человека выделяются ооцисты – бесцветные прозрачные образования длиной 20-30 мкм, с двухконтурной оболочкой (приложение 5 к настоящим методическим рекомендациям). Форма ооцист овальная, несколько вытянутая с одним зауженным концом. В свежесодержимых испражнениях ооцисты незрелые и содержат в центре шарообразную зародышевую массу. При комнатной температуре в течение 2-3 дней этот шар делится поперечно, разделившиеся части покрываются оболочкой – образуются две спороцисты длиной 12-14 мкм. В каждой из них образуются 4 спорозоида вытянутой серповидной формы. Ядро в спорозоите имеет вид светлого пузырька.

В окружающей среде ооцисты сохраняются несколько месяцев. При заглатывании человеком зрелых ооцист с загрязненной водой, пищей, в кишечнике из них освобождаются спорозоиты, внедряются в клетки стенок кишечника и начинают развиваться, вызывая патологический процесс в организме (5).

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КИШЕЧНЫХ ПРОСТЕЙШИХ

Лабораторные исследования по выявлению кишечных простейших складываются из следующих этапов:

1. Сбор и доставка материала.
2. Макроскопический осмотр и выбор материала для приготовления препаратов.
3. Микроскопическое исследование свежих препаратов
4. Микроскопическое исследование препаратов, обработанных йодом.

Сбор проб фекалий и доставка производится в соответствии с методическими рекомендациями «Диагностика и лечение гельминтозов»,

утвержденными Министерством здравоохранения Республики Казахстан от 29.11.2006г.

Для всех вышеуказанных простейших характерны две диагностические стадии: трофозоит (клеточная форма) и циста. Как первая, так и вторая стадии могут выделяться с фекалиями. Трофозоиты обычно обнаруживаются в жидких или полужидких фекалиях; цисты - в оформленном стуле. Однако как одна, так и другая стадии могут обнаруживаться в одной и той же пробе фекалий (приложение 1 и 2 к настоящим методическим рекомендациям).

Трофозоиты и цисты можно наблюдать в нативных препаратах фекалий с физиологическим раствором. В ряде случаев видовая идентификация может потребовать исследования окрашенных препаратов (приложение 1,2 к настоящим методическим рекомендациям).

При лабораторной диагностике кишечных простейших используются следующие методы исследований: приготовление нативных препаратов с физиологическим раствором и раствором Люголя, окраска нативных препаратов буферным метиленовым синим, комплексные методы исследования фекалий на кишечные простейшие из консервантов (метод влажного мазка из консерванта, метод исследования материала с формалин-эфирным обогащением, модифицированный метод окрашивания по Циль-Нильсену, метод окрашенных мазков на криптоспоридии, метод Бермана в модификации для исследования на балантидиаз).

Приготовление нативных препаратов с физиологическим раствором и раствором Люголя (6)

Материал: предметные и покровные стекла, деревянные палочки, стеклянные пипетки, стерильная стеклянная посуда (для забора фекалий), микроскоп.

Приготовление маточного 5% раствора Люголя: 10г йодида калия растворить в 30 мл дистиллированной воды, добавить 5г кристаллического йода, размешать до полного растворения и долить до 100 мл дистиллированной воды. Хранить после приготовления в посуде из темного стекла.

Приготовление рабочего 1% раствора Люголя: 5 мл маточного 5% раствора Люголя соединить с 20 мл физиологического раствора, хорошо перемешать. Хранить в посуде из темного стекла не более 14 дней.

Приготовление уксуснокислого спиртового раствора йода: 10 мл спиртового раствора Люголя (40 мл 70% этилового спирта + несколько кристаллов йода хорошо перемешать, раствор должен иметь цвет «крепкого» чая) + 10 мл 25% раствора уксусной кислоты.

Ход исследования:

- нанести на предметное стекло 1 каплю изотонического теплого (36-37⁰ С) раствора в левой половине и 1 каплю 1% раствора Люголя в правой половине предметного стекла;

- выбрать из пробы фекалий деревянной палочкой патологические примеси или немного фекалий (с булабочную головку) и перенести в каплю физиологического раствора, растереть до получения равномерной не густой эмульсии, а затем такое же количество фекалий поместить в каплю с Люголем и также растереть;

- накрыть капли покровным стеклом (через правильно приготовленный мазок можно видеть газетный шрифт) и микроскопировать.

Окраска нативных препаратов буферным метиленовым синим (БМС) (1)

Приготовление раствора буферного метиленового синего:

Раствор А (раствор уксусной кислоты):

Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH) – 1,2 мл

Дистиллированная вода – 98,8 мл

Дистиллированную воду наливают в чистый флакон или бутылку, прибавляют 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и хорошо перемешивают. Хранят в чистой бутылке.

Раствор В (раствор уксуснокислого натрия):

Уксуснокислый натрий (CH_3COONa) – 1,6 г

Если используют кристаллический уксуснокислый натрий ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) – 2,6 г.

Дистиллированная вода – 100 мл.

В небольшую колбу наливают 100 мл дистиллированной воды. Взвешивают 1,6 г уксуснокислого натрия (или 2,6 г кристаллического уксуснокислого натрия) и растворяют в воде, тщательно перемешивают. Хранят в чистой бутылке.

Рабочий раствор (для окраски):

Раствор А (раствор уксусной кислоты) - 46,3 мл

Раствор В (раствор уксусно-кислого натрия) - 3,7 мл

Краситель метиленовый синий - 0,5 г

Дистиллированная вода – 50 мл.

Наливают 50 мл дистиллированной воды в колбу емкостью 150-200 мл. Доливают растворы А и В и хорошо перемешивают. Прибавляют 0,5 г краски метиленовой синей и встряхивают или перемешивают до полного растворения краски. Если краска не растворяется через 15 минут, раствор следует профильтровать. Раствор краски наливают или фильтруют в чистую бутылку, закрывают пробкой и этикетируют. Небольшое количество раствора (20 мл) наливают в разливную бутылку или в капельницу для использования в текущей работе. Капельница должна иметь пипетку с резиновым колпачком. Наилучшие результаты при работе с этой краской дает использование ацетатного буфера с рН – 3,6.

Ход исследования:

Нативный препарат с буферным метиленовым синим аналогичен методике приготовления препаратов с физиологическим раствором, но вместо физиологического раствора на предметное стекло наносится большая капля БМС.

КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕКАЛИЙ НА КИШЕЧНЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ ИЗ КОНСЕРВАНТА (6)

При необходимости хранения исследуемого материала используются различные консерванты, в которых хорошо сохраняются вегетативные формы и цисты. Консерванты готовят в соответствии с Методическими рекомендациями «Диагностика и лечение гельминтозов», утвержденными Министерством здравоохранения РК от 29.11.2006г.

Метод влажного мазка из консерванта

Материал: предметные и покровные стекла, деревянные палочки и микроскоп, 1% раствор Люголя.

Ход исследования:

- на предметном стекле готовятся два препарата: пипеткой из консерванта с фекалиями осторожно, не взбалтывая содержимое флакона, нанести две капли придонного осадка в правой и левой части стекла;
- растереть деревянной палочкой;
- в одну из капель добавить каплю 1% раствора Люголя;
- каждую каплю накрывают покровным стеклом (покровные стекла можно окантовать вазелином для предотвращения высыхания и смещения покровного стекла) и микроскопируют.

Метод исследования материала из консерванта с формалин-эфирным обогащением на простейшие(6)

Материал: палочки деревянные, центрифужные градуированные пробирки, воронки стеклянные, бинт (марля), стекла предметные и покровные, пипетки стеклянные, пробки резиновые, центрифуга, микроскоп, физиологический раствор, 1% раствор Люголя, этиловый эфир, раствор формалина 10% нейтральный (для нейтрализации – во флакон темного стекла раствором формалина на дно слоем в 1-2 см насыпать порошкообразный углекислый кальций).

Ход исследования:

- перенести пипеткой в центрифужную пробирку осадок фекалий со дна флакона с консервантом в объеме 1,5-2 мл;
- добавить 6-7 мл 10% нейтрального формалина;

- закрыть пробирку резиновой пробкой и тщательно перемешать, энергично встряхивая пробирку в течение 5 секунд;
- полученную взвесь перелить в другую центрифужную пробирку через стеклянную воронку с двухслойным бинтом (марлей);
- добавить 2-3 мл этилового эфира;
- закрыть пробирку пробкой и энергично встряхивать в течение 30с;
- убрать пробку и дать постоять пробирке в течение 2 мин в вытяжном шкафу;
- затем центрифугировать 2 мин при 1500 об/мин или 1-1,5 мин при 3000 об/мин;
- отделить палочкой образовавшуюся «каловую пробку» от стенок пробирки;
- перевернуть пробирку дном вверх и вылить содержимое (можно ватным тампоном обтереть стенки пробирки, чтобы жидкость не стекла на дно и не увеличивала объем осадка), пробирку поставить в штатив;
- на предметное стекло по обе стороны от центра нанести по капле физиологического раствора и раствора Люголя;
- перенести на каждую каплю осадок из центрифужной пробирки, размещать деревянной палочкой, накрыть каждую каплю покровным стеклом и микроскопировать.

Модифицированный метод окрашивания по Циль-Нильсену

Материал: палочки деревянные, предметные стекла, химические стаканчики или мостики для окрашивания мазков, стеклянные палочки, кюветы эмалированные, микроскоп, смесь Никифорова, 10% серная кислота, фуксин основной, фенол.

Ход исследования:

- на предметное стекло нанести пипеткой каплю осадка из центрифужной пробирки после обогащения и круговым движением палочки приготовить мазок (можно добавить каплю физиологического раствора, чтобы мазок не был густым);
- высушить на воздухе (тщательно);
- фиксировать мазок в смеси Никифорова в течение 20-30 мин.;
- после фиксации мазок высушить на воздухе;
- окрашивать мазок в растворе карболового фуксина, поместив мазок в химический стаканчик с этой краской на 45 мин.;
- промыть мазок проточной водой;
- обесцветить мазок в 10% растворе серной кислоты до прекращения отхождения розовых пузырьков красителя;
- промыть тщательно проточной водой;
- подкрасить мазок 5% раствором малахитового зеленого, приготовленного на 10% этиловом спирте, в течение 2-5 мин;
- промыть мазок в воде, высушить на воздухе и микроскопировать.

Методы окрашенных мазков на криптоспоридиоз (6)

Материал: предметные стекла, стеклянные или деревянные палочки, горелка (спиртовка), кюветы эмалированные, мостики стеклянные или «контейнеры» для окраски мазков, пипетки, стеклянные капилляры, груши резиновые, химические стаканчики, центрифужные пробирки объемом 15 мл, металлические петли, центрифуга, микроскоп, фуксин основной, этиловый спирт, фенол, раствор серной кислоты 7% (5-10%), раствор малахитовой зелени 5% в 10% этиловом спирте, водный раствор метиленового синего 0,2%, раствор малахитового зеленого 5%, азур-эозин по Романовскому-Гимза 10% раствор, флотационные растворы.

Подготовка к работе:

Приготовление рабочего раствора краски по Цилю-Нильсену:

- фуксина основного 2 г растворить в 12 мл спирта 96%;
- фенола 5 г растворить в 50 мл дистиллированной воды;
- слить вместе растворы фуксина и фенола, долить дистиллированной воды до 100 мл, перемешать.

Подготовка материала для исследования:

Из фекалий приготовить мазок одним из следующих способов:

1) Нативный мазок:

- нанести на предметное стекло небольшое количество фекалий;
- растереть фекалии тонким слоем;
- тщательно высушить мазок на воздухе.

2) Обогащение флотационным методом:

- приготовить флотационный раствор (в качестве флотационного раствора использовать насыщенный раствор хлористого натрия или насыщенный раствор сульфата цинка – 331 г сульфата цинка на 1 л водопроводной воды);

- разбавить фекалии водой, размешать;
- процедить разбавленные фекалии через 2-х-слойный бинт в центрифужную пробирку;
- центрифугировать при 1500 об/мин в течение 3-4 мин.;
- удалить жидкость над осадком (объем оставшегося осадка не должен превышать 1 мл).

- добавить флотационную жидкость до половины объема пробирки и размешать содержимое пробирки стеклянной палочкой;

- добавить флотационную жидкость до верхнего края пробирки;
- центрифугировать при 1500 об/мин в течение 3-4 мин;
- собрать поверхностную пленку металлической петлей или стеклянным капилляром и поместить на предметное стекло.

3) Обогащение методом седиментации:

- поместить в пробирку 0,5-1 г фекалий;
- залить 10-12 мл изотонического раствора хлорида натрия;
- перемешать содержимое пробирки до образования однородной суспензии;

- процедить суспензию через двойной слой марли в другую пробирку и центрифугировать;
- слить надосадочную жидкость;
- повторно залить осадок изотоническим раствором хлорида натрия и центрифугировать;
- слить надосадочную жидкость;
- перенести осадок пипеткой на предметное стекло и приготовить из осадка мазок.

Ход исследования:

- высушить мазки на воздухе (мазки, приготовленные одним из способов, описанных в пп. А,Б,В);
- фиксировать мазки в смеси Никифорова (96% этиловый спирт и эфир в соотношении 1:1) в течение 10-15 мин;
- высушить на воздухе;
- фиксированные и высушенные мазки быстро провести 3-5 раз над пламенем горелки;
- поместить мазок в рабочий раствор карбол-фуксина на 5-10 мин;
- промыть мазок водопроводной водой, обесцветить 7% раствором серной кислоты в течение 20-60 сек и промыть в воде;
- подкрасить в течение 5 мин 5% раствором малахитовой зелени и промыть в воде, затем высушить на воздухе и микроскопировать.

Метод Бермана в модификации для исследования на балантидии (7)

Материал: химические стаканчики, палочки деревянные, чашки Петри, пробирки центрифужные, центрифуга, микроскоп, дистиллированная вода.

Ход исследования:

- в химический стаканчик или в чашку Петри положить порцию фекалий 10-15 г (величиной с орех), предварительно перемешав фекалии;
- залить теплой (45⁰С) дистиллированной водой, чтобы фекалии были полностью покрыты;
- через 1,5-2 ч слить жидкость в центрифужные пробирки;
- центрифугировать 2 мин при 1500 об/мин;
- надосадочную жидкость слить, осадок с помощью стеклянной пипетки перенести на предметное стекло (по 2 капли на каждое стекло), накрыть покровными стеклами и микроскопировать.

Микроскопическое исследование дуоденального содержимого

Материал: этиловый эфир, центрифуга, центрифужные пробирки, предметные стекла, пипетки, чашки Петри, палочки стеклянные или деревянные, микроскоп.

Подготовка к работе: Желчь в лабораторию должна быть доставлена сразу после зондирования. В желчи, исследуемой сразу после зондирования,

обычно обнаруживаются вегетативные подвижные формы лямблий. При исследовании желчи через несколько часов после зондирования (но в день забора материала) обычно подвижность вегетативных форм лямблий не наблюдаются.

Ход исследования

1. Исследование нативного мазка желчи:

- выбрать сгустки слизи, волокон, патологические примеси;
- палочкой стеклянной или деревянной (можно пипеткой) нанести тонким слоем желчь на предметное стекло (мазок не должен стекать с предметного стекла);
- при исследовании в чашке Петри налить желчь тонким слоем на дно чашки
- микрофотографировать без покровного стекла при увеличении: объектив x8 или x 10, окуляр x10; для уточнения морфологии яиц гельминтов и для исследования на простейших – объектив x40. Для обнаружения подвижных личинок стронгилоидеса можно микрофотографировать в чашках Петри под стереомикроскопом (окуляр x 2; объектив x 12,5-14).

2. Исследование желчи с центрифугированием:

- при наличии в желчи большого количества слизи или гноя взболтать все порции с равным количеством эфира;
- центрифугировать в центрифужных пробирках все порции дуоденального содержимого не менее 20 мин при 1500-2000 об/мин;
- надосадочную часть желчи слить в отдельную емкость;
- осадок перенести пипеткой или прямо из пробирки на предметное стекло;
- микрофотографировать без покровного стекла при увеличении: объектив x 8 или x10, окуляр x 10; и для уточнения морфологии яиц гельминтов и для исследования на простейших – объектив x40;
- для обнаружения подвижных личинок стронгилоидеса можно микрофотографировать в чашках Петри под стереомикроскопом (окуляр x2; объектив x 12,5-14).

Применение метода: для выявления вегетативных и цистных форм простейших – лямблий.

Основные серологические методы исследования при диагностике протозоозов

При диагностике протозоозов применяются следующие серологические методы исследования: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

Серологическими методами выявляются следующие виды протозоозов:

ИФА: криптоспоридиз, лямблиоз, амебаз.

РНГА: амебаз

РИФ: малярия, амебиаз, лямблиоз.

Серологические методы относятся к косвенным методам исследования, которые направлены на определение антител или антигенов в сыворотке крови или фекалиях. В настоящее время в целом по республике из серологических исследований применяется иммуноферментный анализ.

Заключение

В настоящих методических рекомендациях изложены методы лабораторной диагностики кишечных простейших: кишечных амёб, лямблий, кокцидий, криптоспоридий, балантидий; их морфологические характеристики и признаки в разных видах препаратов и отдельно по каждому виду простейших.

Методические рекомендации представляют ценность для практических врачей центров санитарно-эпидемиологической экспертизы и специалистов клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических организаций.

Список использованной литературы:

1. «Основные методы лабораторной диагностики паразитарных болезней», Сб.ВОЗ, Женева, 1994.
2. Гордон Е.И., Засухин Д.Н., Лысенко А.Я. «Лабораторные методы исследования патогенных простейших», Москва, 1957.
3. Лысенко А.Я., Красильников А.А. «Лабораторные методы диагностики паразитарных болезней», Москва, 1999.
4. Авдюхина Т.И., М.Г.Владимова, Т.Н. Константинова, Ю.П.Горбунова «Лямблиоз», Москва, 1999г.
5. Генис Д.Е. «Медицинская паразитология», Москва, 1991.
6. В.Н.Тимченко, В.В.Леванович, Н.С.Абдукаева, В.В.Васильев, И.Б.Михайлов «Паразитарные инвазии в практике детского врача», Санкт-Петербург, 2005г.
7. МУК 4.2.735-99 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов», утв. МЗ РФ от 25.04.1999г.
8. Ю.П.Горбунова «Лабораторная диагностика кишечных протозоозов», Москва, 1989г.
9. МР к практическим занятиям «Лабораторная диагностика кишечных протозоозов» (сравнительные признаки простейших, паразитирующих в кишечнике человека), Москва, 1990.
- 10.к.б.н. Цыбина Т.Н , Сыскова Т.Г. «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов», Москва, 2000г.
11. А.Б.Виноградов, С.Г.Глумов, Т.Д.Афоница, О.А.Боброва, Е.И.Матюнина, Е.В.Челпанова, С.И.Шилова, Л.Г.Щелкова «Медицинская паразитология», Ростов-на-Дону, 2006г.
- 12.Р.Х. Яфаева « Медицинская паразитология», Санкт-Петербург, 2003г.
- 13.Сергиев В.П., Лобзина Ю.В., С.С.Козлова «Паразитаные болезни человека», Санкт-Петербург, 2008г.
14. С.А. Амиреев, Т.А.Муминов, В.П.Сергиев, К.С.Оспанов «Стандарты и алгоритмы мероприятий при инфекционных и паразитарных болезнях», Алматы, 2008г.

Приложение 1
к методическим рекомендациям
«Лабораторная диагностика кишечных
простейших»

Морфологические признаки простейших в разных видах препаратов

	Физиологический раствор	Временно окрашенные препараты		Постоянно окрашенные препараты Трихром ^в
		БМС ^а	Йод ^б	
<i>1. Амебы</i>				
Трофозоиты				
Подвижность	+	-		-
Цитоплазма	+	+		+
Включения	+	+		+
Ядро	-	+		+
Цисты				
Ядра	-		+	+
Хроматоидные тельца	+		+ ^г	+
Гликоген ^д	-		+	-
<i>2. Жгутиковые</i>				
Трофозоиты				
Подвижность	+		-	-
Форма	+		+	+
Ядро	-		+	+
Цисты				
Форма	+		+	+
Ядра	-		+	+
Фибриллы	+ ^е		+	+

^а Краска БМС (буферный метиленовый синий) используется только для окраски живых трофозоитов амеб.

^б Йод используется для окраски цист, хотя трофозоиты жгутиковых также при этом могут окраситься.

^в Постоянно окрашенные препараты обычно не используются в диагностических лабораториях, но их применяют по специальным показаниям, описанным далее в тексте (например, для диагностики криптоспориоза).

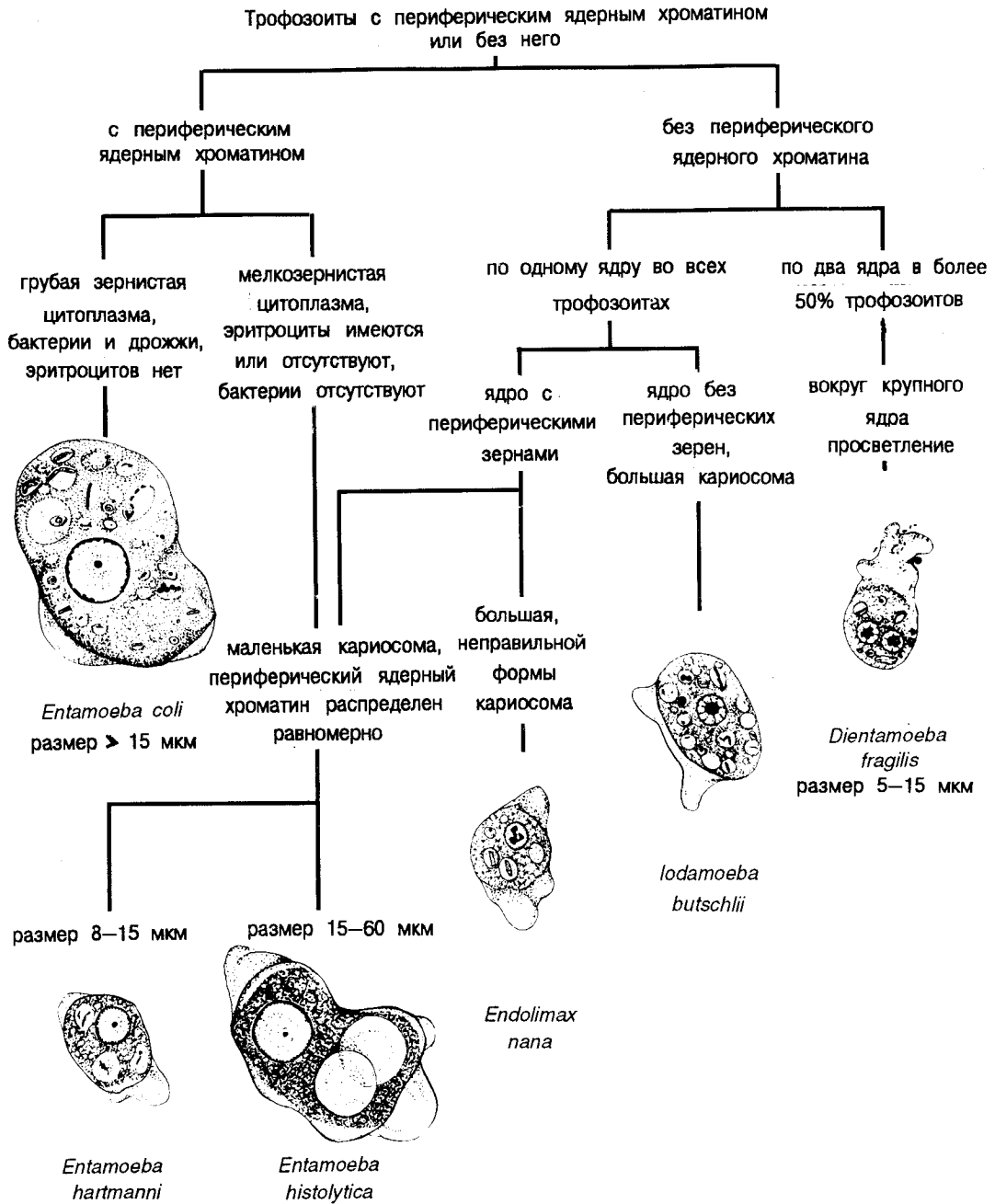
^г Хроматоидные тельца в цистах амеб лучше видны в нативных препаратах с физиологическим раствором, чем в нативных препаратах, окрашенных йодом. Лучше всего их видно в постоянно окрашенных мазках.

^д Гликоген растворяется во время процесса окраски, и в постоянно окрашенных мазках будут видны только пустые места (вакуоли).

^е Фибриллы (филаменты) иногда можно увидеть в нативных препаратах с физиологическим раствором.

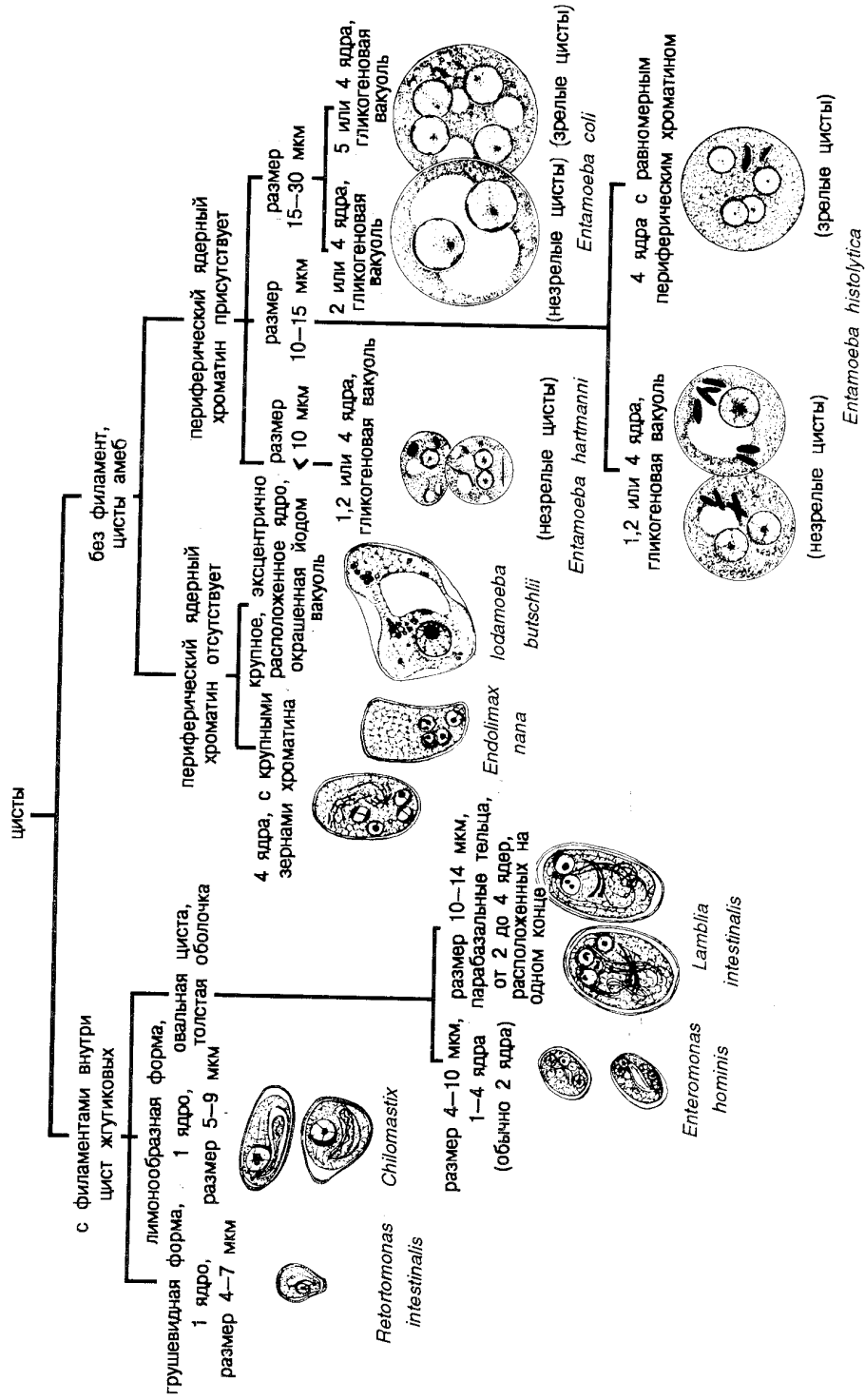
Приложение 2
к методическим рекомендациям
«Лабораторная диагностика кишечных
простейших»

Определитель трофозоитов амёб в окрашенных мазках



Приложение 3
к методическим рекомендациям
«Лабораторная диагностика кишечных
простейших»

Рис. . Определитель цист амёб и жгутиковых простейших



Приложение 4
к методическим рекомендациям
«Лабораторная диагностика кишечных
простейших»

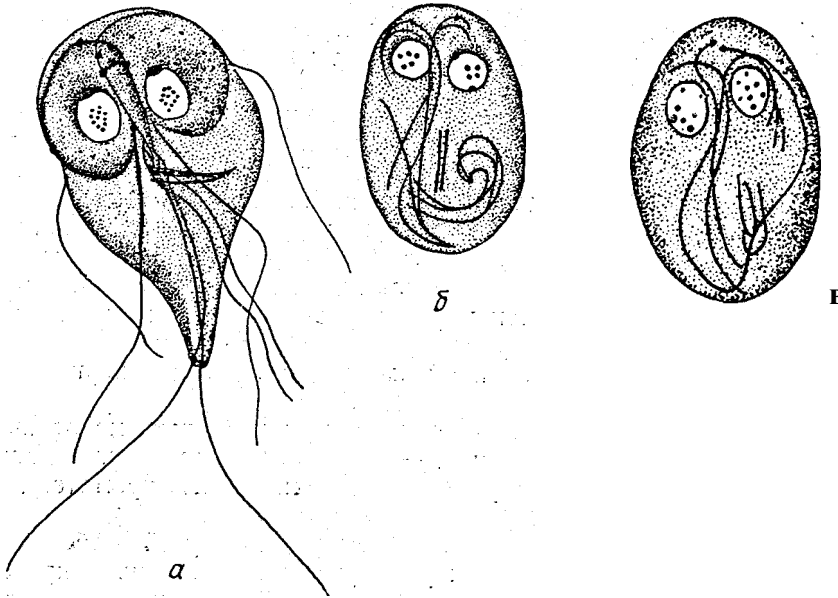


Рисунок 1 - Лямблии (*Lambllia intestinalis*): а – вегетативная форма; б, в – цисты.

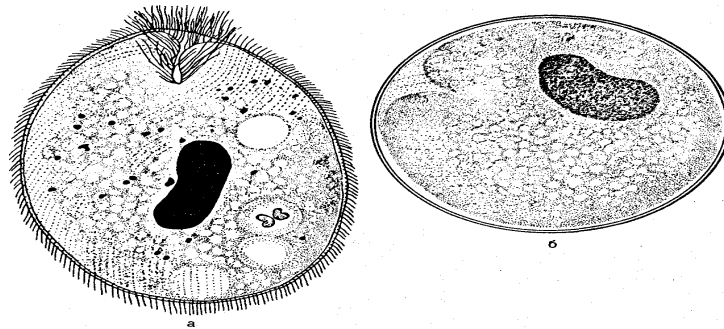


Рисунок 2 - Балантидий (*Balantidium coli*): а – вегетативная форма; б - циста

Приложение 5
к методическим рекомендациям
«Лабораторная диагностика кишечных
простейших»

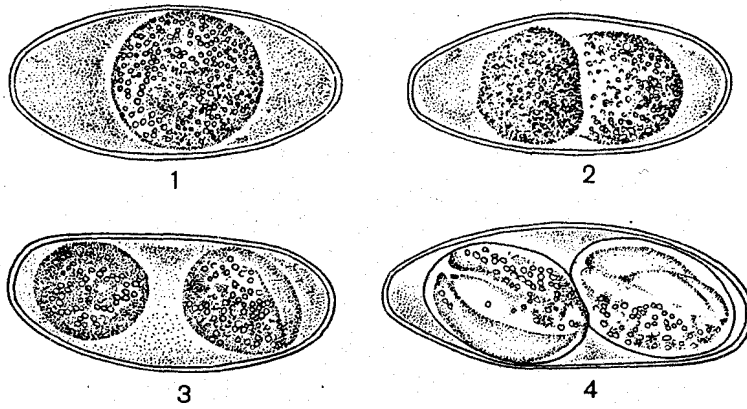


Рисунок 2. Ооцисты кокцидии (*Isospora belli*): 1 – ооциста с неразделившейся цитоплазмой (из свежевыделенных испражнений); 2,3 – образование споробластов; 4 – ооциста с двумя спороцистами, содержащими по 4 спорозоида.