МУЗ «Первая городская клиническая больница скорой медицинской помощи»

СЕВЕРНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КУРС КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Руководитель курса

Проф. Воробьёва Н.А.

**Лабораторная диагностика инфекций, передаваемых половым путём**

Выполнила

врач-интерн КДЛ

Петрова Л.В.

г. Архангельск

2008 г.

**Введение**

Эпидемиологическая ситуация, связанная с эпидемическим ростом заболеваний, передаваемых половым путем (ЗППП), стала настолько серьезной, что послужила темой выделения основных проблем современной венерологии и лабораторной диагностики:

1.эпидемический рост сифилиса;

2.появление «новых» ЗППП (урогенитальный хламидиоз, генитальный герпес, микоплазмозы и т.д.), ранее в России не регистрировавшихся;

3.резкое омоложение носителей;

4.существенные перемены в социальном и имущественном статусе пациентов с ЗППП (повышение финансовых возможностей) переводит людей в группу повышенного риска;

5.повышение вероятности вспышки СПИД, поскольку при росте ЗППП, сопровождающихся нарушением целости кожных покровов (сифилис, герпес), увеличивается возможность проникновения вируса в кровь;

6.одновременное обнаружение у пациента нескольких инфекций с различными подходами к диагностике и лечению, что может привести к неадекватной и несвоевременной терапии;

7.трудности регистрации и контроля ЗППП в современных условиях (миграция населения, локальные конфликты, «прозрачность» границ со странами СНГ, расширение возможностей лечения ЗППП вне официальной медицины).

Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путём, имеет большое значение как для выявления больных, так и для установления эффективности проведённой терапии.

В данной работе разберём такие распространенные инфекции как сифилис, гонорея, трихомониаз и хламидиоз, а также методы их диагностики.

**1 Сифилис**

Сифилис – общее инфекционное заболевание, склонное к хроническому рецидивирующему течению с характерной периодизацией клинических симптомов.

## Морфология, устойчивость и культуральные свойства бледных трепонем

Возбудитель сифилиса – бледная трепонема (Treponema pallidum) – микроорганизм спиралевидной формы с одинаковыми по высоте завитками и расстоянием между ними. Обладает характерными движениями:

* Роторное (вокруг своей продольной оси);
* Маятникообразное (поступательное);
* Контактильное волнообразное по всему телу.

Бледная трепонема размножается путем поперечного деления, может существовать в 4 формах (спиралевидная, зернистая, цистная и L‑форма), что вызывает разные клинические варианты течения болезни. В очагах поражения бледная трепонема чаще располагается в межклеточных щелях, в субэндотелиальном пространстве, в пери– и эпиневрии.

Культивирование бледных трепонем на искусственных питательных средах требует сложных специальных сред и анаэробной установки. Культуральные бледные трепонемы быстро теряют свою вирулентность, патогенность и морфологические свойства. Патогенные бледные трепонемы неустойчивы в окружающей среде, на них губительно действует высушивание. Нагревание до 60°С убивает их в течение 15 мин, а до 100°С – моментально. Бледные трепонемы мгновенно погибают в 0,005% растворе хлоргексидина, растворе сулемы 1:1000, 1‑2% растворе фенола, 70° спирте. Кислая и щелочная среда действуют на них губительно. Во влагалищном секрете, который имеет обычно кислую реакцию, трепонемы сразу теряют подвижность.

## Эпидемиология сифилиса

Инфицирование происходит половым путем, но возможна передача интраплацентарно (врожденный сифилис), при бытовых контактах (бытовой сифилис) и, в редких случаях, при переливании крови (гемотрансфузионный сифилис). Непосредственная передача возбудителей сифилиса возможна и внеполовым путем – при поцелуях, укусах, кормлении грудью, а также при профессиональных прямых контактах медицинского персонала (гинекологов, хирургов, патологоанатомов, лаборантов и др.).

Важными условиями заражения сифилисом являются наличие в материале от больного достаточного числа вирулентных трепонем, нарушение целости кожного покрова или слизистых оболочек.

## Общее течение сифилиса

В течение сифилиса принято различать следующие стадии:

1) инкубационный,

2) первичный,

3) вторичный,

4) третичный.

Инкубационный период – 3 – 6 мес. Первичный период разделяют на серонегативный и серопозитивный, вторичный – на свежий, скрытый и рецидивный, третичный – на активный и скрытый.

Первичный период сифилиса (syphilis primaria) – начальная стадия болезни – манифестирует образованием на месте внедрения бледной трепонемы – первичного аффекта (первичной сифиломы, или твердого шанкра), обусловленного скоплением бледных трепонем. Проникновение трепонем, распространение их по лимфатическим пространствам, в эндо– и периневрии сопровождается продромальными симптомами. Могут выявляться позитивные, но слабо положительные РИФ, РСК, РВ. Необходимо повторное серологическое обследование. Таким образом, первичный период подразделяется на 2 равные стадии: серонегативный, протекающий не более 3 - 4 нед, и серопозитивный, длящийся 3 - 4 нед, завершающийся симптомами вторичного периода при отсутствии лечения.

Вторичный период сифилиса (syphilis secundaria) манифестирует изменениями на коже и слизистых оболочках. Генерализация инфекции проявляется множественными воспалительными процессами в различных органах и тканях. Начальным сигналом служит сопутствующий твердому шанкру регионарный аденит, трансформирующийся в полиаденит, сопровождающийся лихорадочным состоянием, недомоганием, астенизацией, болями в костях, суставах, головными болями, анемией, лейкоцитозом, увеличением СОЭ. Формирующаяся органная патология проявляется гепатитом, панкреатитом, нефрозонефритом, или поражением опорно-двигательного аппарата, нервной системы.

Вторичный период сифилиса варьирует по течению от 2 до 3 – 5 лет при отсутствии лечения. Подразделяется на вторичный свежий (syphilis secundaria recens), скрытый, или латентный (syphilis secundaria latens), который с целью проведения необходимых эпидемиологических мероприятий делят на скрытый ранний и скрытый поздний. Заключительным этапом вторичного периода сифилиса является рецидивный сифилис (syphilis secundaria recidiva).

Третичный период сифилиса (syphilis tertiaria) характеризуется стадийным течением проявлений инфекции, вследствие чего его подразделяют на третичный скрытый и третичный активный. В возникновении третичного сифилиса большое значение придается травме (физическая, механическая, медикаментозная, психологическая и др.), а также факторам, ослабляющим иммуноэкологические защитные силы организма (очаги хронической инфекции, интоксикации, соматические заболевания, алкоголизм, наличие дополнительной венерической инфекции типа хламидиоза, микоплазмоза). В позднем третичном периоде, помимо позднего висцерального сифилиса, возможны явления поздних форм нейросифилиса (спинная сухотка, прогрессивный паралич).

## Лабораторная диагностика сифилиса

Наряду с традиционными разрабатываются новые более чувствительные и специфические методы. Особенности биологии бледной трепонемы обусловливают вариабельные ответы организма-хозяина, что клинически выражается в многофазности течения заболевания и сложности серологических реакций.

Методы обнаружения бледных трепонем традиционно подразделяют на прямые (заражение животных, микроскопия в темном поле и т.д.) и непрямые серологические тесты для выявления AT. В свою очередь, серологические методы представлены двумя классами:

1) Нетрепонемные тесты, определяющие AT к липоидным АГ тканей хозяина или возбудителя (VDRL и RPR – плазмореагиновый тест); реактивность в этих местах обычно указывает на повреждение тканей и не всегда специфична в отношении сифилиса. Простота выполнения и низкая стоимость этих тестов позволяет использовать их как отборочные реакции для постановки предварительного диагноза сифилиса при соответствующих клинических симптомах.

2) Трепонемные тесты, в которых используются специфические АГ трепонем, обязательны для подтверждения диагноза (микрогемагглютинационный тест на AT к бледной трепонеме, РПГА и РИФ). Они являются более сложными и дорогостоящими, чем тесты 1-й группы.

В перспективе предполагается использование новых прямых методов определения возбудителя – ИФА и ПЦР, клинические испытания которых дают хорошие результаты при диагностике врожденного сифилиса и нейросифилиса.

Прямая визуализация патогенных трепонем является широко используемым и доступным методом бактериологического их обнаружения. Он заключается в исследовании возбудителя сифилиса непосредственно в тканевой жидкости из высыпных элементов, подозрительных на сифилитические проявления. Тканевую жидкость, полученную способом аппликации, скарификации или пункции, исследуют в наивном препарате в темном поле зрения или в окрашенных препаратах (по Романовскому‑Гимзе, по Бурри или после импрегнации по Фонтану и Морозову). Трепонемы можно выявить в экссудате из очагов поражения при первичном, вторичном свежем, вторичном рецидивном сифилисе, в пунктате, полученном из лимфатических узлов, в соке плаценты при родах. Отсутствие трепонем в типичных очагах поражения может быть обусловлено длительностью существования очага или предварительным лечением пациентов.

### Серологическая диагностика

При серологическом обследовании на сифилис применяется комплекс реакций: стандартные (КСР) – реакция Вассермана с двумя‑тремя антигенами и две осадочные реакции (Кана и цитохолевая); при необходимости рекомендуется постановка более чувствительных и специфических реакций РИБТ и РИФ. Особенно велико значение РИБТ и РИФ для распознавания ложноположительных результатов стандартных серологических реакций и ретроспективной диагностики сифилиса.

КСР позволяет выявить значительное число больных сифилисом в разных стадиях заболевания. При замене неспецифических антигенов трепонемными и при постановке серологических реакций на холоде (реакция Колмера) можно повысить процент выявления и увеличить специфичность реакции. Применение в качестве обязательных антигенов кардиолипинового антигена, трепонемного озвученного антигена из протеиновой фракции патогенных или культуральных трепонем дает возможность судить об иммунном состоянии больного сифилисом при постановке диагноза, определении результатов терапии и критерия излеченности (в совокупности с другими показателями). Кроме того, серологическое обследование проводится лицам, поступающим на работу в детские учреждения, на пищевые предприятия и ряд других производств при периодическом обследовании декретированных контингентов. Обязательному серологическому обследованию подвергаются доноры, а также больные терапевтических, неврологических, психиатрических и других стационаров.

Для выполнения комплекса серологических реакций требуется высококвалифицированный персонал лабораторий, соответствующее лабораторное оборудование и значительное количество ингредиентов. Многочисленность серологических реакций объясняется тем, что доказана антигенная мозаичность бледных трепонем, а в связи с этим и наличие в сыворотке крови больного сифилисом соответствующей множественности антител (реагины, комплементсвязывающие и полисахаридные антитела, агглютинины, иммобилизины, антитела, вызывающие иммунную флюоресценцию, и др.). В каждой стадии сифилиса преобладают те или иные антитела и, следовательно, реакции с одними антителами могут быть уже положительными, а с другими – еще отрицательными. Кроме того, относительная специфичность стандартных серореакций побуждает в целях избежания диагностических ошибок пользоваться не одной из этих реакций, а их комплексом. Несмотря на такой комплексный подход при серологическом обследовании пациента, следует помнить, что в ряде случаев даже весь комплекс может давать ложноположительный, неспецифический, результат. Ложноположительные серологические реакции в крови наблюдаются при малярии, сыпном и возвратном тифе, лепре, бруцеллезе, пневмонии, скарлатине, при злокачественных новообразованиях, во время менструаций, за 2 нед до родов и в течение 3 нед после родов, после приема алкоголя, жирной пищи, некоторых лекарственных препаратов, при хронических гнойных процессах, болезнях печени и др. Установлено, что с увеличением возраста пациентов возрастает количество неспецифических ложноположительных результатов стандартных серореакций. Все это заставляет весьма осторожно относиться к показателям серологического обследования пациентов и считать серореакций ценной, но вспомогательной методикой, подтверждающей данные клинической картины, результаты других лабораторных исследований (на бледную трепонему, спинномозговой жидкости), результаты конфронтации.

#### Реакция Вассермана (РВ)

Основана на феномене связывания комплемента. В постановке реакции используют как специфические антигены из бледных трепонем, так и неспецифические антигены (экстракты из органов здоровых животных, например, мышцы бычьего сердца). Связывание комплемента производится комплексом (липоидный антиген и реагин испытуемой сыворотки). Для индикации образовавшегося комплекса применяют гемолитическую систему (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). При постановке РВ с кардиолипиновым антигеном ее чувствительность возрастает.

В связи с большим объемом профилактических обследований и сложностью выполнения КСР в настоящее время широко применяется экспресс-метод серодиагностики сифилиса, когда не требуется брать кровь из вены.

#### Ускоренный метод серодиагностики сифилиса

Техника постановки реакции с плазмой. Кровь в пробирке при стоянии разделяется на два слоя. Нижний содержит эритроциты, а верхний – плазму. Пастеровской пипеткой отсасывают плазму, стараясь не захватить эритроциты. При недостаточном количестве плазмы пробирку с кровью следует отцентрифугиоовать в течение 5 - 10 мин при 1000 ‑ 2000 об/мин. В лунку пластинки из органического стекла вносят кровь от 1 больного и нумеруют лунку соответственно составленному списку. В каждой лунке к 2 - 3 каплям плазмы добавляют по 1 капле эмульсии антигена; капли перемешивают, и смесь встряхивают в течение 5 мин, затем во все лунки добавляют по 1 капле изотонического раствора натрия хлорида; смесь перемешивают покачиванием и оставляют при комнатной температуре на 5 мин. В плазме, полученной от больного сифилисом, появляются хлопья разной степени интенсивности, расцениваемые как положительный результат (3+, 4+), слабо положительный (2+, 1+). При отсутствии сифилиса иногда может быть слабо выраженный флокулят, поэтому учет результатов следует производить, ориентируясь на характер реакции в контролях. Поскольку микрореакция носит отборочный характер, при получении положительных результатов сыворотку крови исследуют в КСР, а при необходимости – в РИБТ и РИФ.

#### Реакция с липоидным антигеном (VDRL)

Одним из лучших стандартных методов, в которых используются липоидные антигены, является рекомендуемая ВОЗ реакция VDRL. Название этой реакции происходит от заглавных букв учреждения, где она была разработана, – Venereal Diseases Research Laboratory в Атланте. Антиген добавляют к инактивированной сыворотке больного, помещаемой на предметное стекло, которое вращают в течение 4 - 5 мин при комнатной температуре и сразу регистрируют результат: наличие в сыворотке реагинов вызывает макроскопически видимую флокуляцию. Реактоспособность сыворотки в реакции VDRL выявляется примерно через 4 нед после заражения сифилисом. Количественную оценку циркулирующих антител получают путем разведения сыворотки перед постановкой реакции в геометрической прогрессии: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Ложноположительные результаты могут обусловливаться аутоантителами при заболеваниях, протекающих с нарушениями иммунитета (красная волчанка, ревматизм, болезнь Шегрена, дисгаммаглобулинемия), а также при заболеваниях, связанных с усиленным разрушением клеточных ядер (малярия, пситтакоз, вирусная пневмония, карцинома).

Главными достоинствами реакции VDRL являются:

* низкая стоимость, легкость постановки,
* быстрое получение результатов с довольно высокой чувствительностью,
* специфичностью, хотя и меньшей, чем в реакции с трепонемным антигеном.

#### Реакции иммунофлюоресценции

Все большее значение приобретают специфические серологические реакции РИФ и РИБТ.

Принцип РИФ основан на выявлении флюоресцирующих антител, так как меченные флюорохромом антитела не теряют способности соединяться с соответствующим антигеном и тем самым обусловливают свечение препаратов в сине-фиолетовых лучах, источником которых является ртутно-кварцевая лампа.

Отличительной чертой РИФ, по сравнению со стандартными серореакциями, является более высокая чувствительность (поэтому она бывает положительной у ряда больных в первичном серонегативном периоде сифилиса) при сохранении высокой специфичности. Однако, РИФ уступает по специфичности РИБТ, хотя по технике постановки она значительно проще.

Реакция ставится в нескольких модификациях: РИФ-ц, РИФ-200 и РИФ-абс. Считается, что РИФ-ц более чувствительна, а РИФ-200 и РИФ-абс – более специфичны.

Реакция ставится непрямым методом в 2 фазы. В первой фазе реакции на антиген наносится испытуемая сыворотка крови. Если в ней имеются соответствующие антитела, то образуется комплекс антиген – антитело. Для выявления образовавшегося комплекса проводится вторая фаза реакции, при которой его обрабатывают меченной флюорохромом иммунной кроличьей сывороткой (против сывороточных глобулинов человека)

Полученный во второй фазе комплекс антиген-антитело определяется с помощью люминесцентной микроскопии. Если свечения антигена нет, то это указывает на отсутствие в испытуемой сыворотке крови соответствующих антигену антител.

Наиболее ценной модификацией РИФ является РИФ-200, основным назначением которой считается не ранняя серодиагностика сифилиса, а распознавание неспецифических результатов КСР и серодиагностика других форм сифилитической инфекции, в том числе и скрытого сифилиса. При установлении излеченности сифилиса решающим является отрицательный результат РИФ-200. не обладает абсолютной специфичностью, поэтому вопрос о наличии или отсутствии заболевания должен решаться на основании совокупности клинических, серологических и других данных.

Техника постановки РИФ-200. Из антигена готовят препараты на тонких, обезжиренных предметных стеклах, на обратной стороне которых обозначены кружки диаметром 1 см. Антиген в пределах кружка, и высушенный на воздухе мазок фиксируют в течение 5 мин в чистом ацетоне. После фиксации стекла помещают во влажную камеру. Инактивированные испытуемые сыворотки крови разводят в 200 раз изотоническим раствором натрия хлорида. Для проведения первой фазы реакции на помещенные во влажную камеру препараты наносят испытуемые сыворотки. После этого влажную камеру закрывают и помещают в термостат при +35°С на 30 мин. По истечении этого времени препараты вынимают из влажной камеры, промывают в течение 10 мин в двух порциях изотонического раствора натрия хлорида и помешают в штатив для высушивания. После высушивания препараты вновь помещают во влажную камеру и наносят по капле разведенной по титру флюоресцирующей сыворотки против глобулинов человека. Вторую фазу реакции проводят при комнатной температуре, после чего препараты 10 мин промывают в изотоническом растворе натрия хлорида, высушивают и монтируют для люминесцентной микроскопии. Монтирование препаратов заключается в том, что на них стеклянной палочкой наносят маленькие капли забуференного глицерина, накрывают их тонкими, обезжиренными предметными стеклами, на которые стеклянной палочкой наносят по капле нелюминесцирующее иммерсионное масло. Исследование препаратов производят в люминесцентном микроскопе. Степень свечения трепонем, зависящая от количества антител в сыворотке крови, обозначается плюсами. Свечение считается положительным, если его оценивают как 4+, 3+ и 2+.

#### Реакция иммунофлюоресценции-абсорбции с БТ (FTA‑ABS)

Используемый для реакции антиген представляет собой взвесь бледных трепонем из пораженных сифилисом яичек кролика, фиксированную ацетоном на предметном стекле. Можно также использовать лиофилизированные бледные трепонемы после их восстановления в изотоническом растворе натрия хлорида. Инактивированную сыворотку инкубируют с сорбентом для абсорбирования неспецифических групповых антител. Затем сыворотку помещают пипеткой на антиген, находящийся на предметном стекле. Специфические антитела связываются бледными трепонемами. После промывания к трепонемам на предметном стекле добавляют комплекс античеловеческого глобулина с флюоресцентным красителем. Этот комплекс связывается с человеческим глобулином на оболочке клеток бледных трепонем и может быть идентифицирован методом флюоресцентной микроскопии. По прошествии не менее 2 ч по степени флюоресценции сыворотку можно классифицировать как нереактоспособную, пограничную или реактоспособную. Реакция, обозначаемая двумя плюсами или больше, свидетельствует об инфекции.

Появления реактоспособности можно ожидать примерно в начале 3-й недели после заражения, а у нелеченных больных она обнаруживается постоянно. Сыворотка остается реактоспособной и через несколько лет после успешного лечения раннего сифлиса, а у больных, получивших адекватное лечение при позднем сифилисе, – на протяжении десятилетий.

Главными достоинствами реакции FTA‑ABS являются:

* высокая специфичность и чувствительность,
* быстро наступающая реактоспособность.

Положительная FTA‑ABS может иметь решающее значение для диагностики в сомнительных случаях, особенно при положительных реакциях VDRL или автоматизированной реакции микрогемагглютинации (АМНА‑ТР), используемых для скрининга.

#### Реакция 19S IgM-FTA-ABS

При идентификации антител IgM к бледным трепонемам реакцией FTA‑ABS с использованием конъюгата анти-IgM в качестве реагента выявлялись ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Реакция 19S IgM-FTA-ABS в этом отношении является наиболее точным, специфичным методом. В целях отделения крупных молекул 19S IgM от более мелких молекул 7S IgM используется методика ультрацентрифугирования, адсорбирования на белке А и гель-фильтрация с применением ультрагеля АсА 34 с трисбуфером при рН 8,0 на колонке К 26/100 при объеме геля 300 мл, скорости потока 27 мл/ч и +240С. В этой системе первый пик элюата содержит фракцию 19S IgM. В процессе фильтрования отделяются непрочные иммунные комплексы. Использование фракции 19S IgM в реакции FTA-ABS обеспечивает высокую специфичность, устраняя возможность неспецифических, ошибочных результатов.

#### Реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ)

Основное назначение – распознавание ложноположительных результатов при постановке стандартных серологических реакций. Это важно у больных с отсутствием клинических проявлений активного сифилиса или имеются поражения внутренних органов или нервной системы. Роль в распознавании ложноположительных результатов стандартных серологических реакций у беременных.

Сущность реакции заключается в потере подвижности бледными трепонемами в присутствии иммобилизинов испытуемой сыворотки и активного комплемента. Реакция ставится в условиях анаэробиоза.

Иммобилизины появляются в сыворотке крови больных позднее, чем другие антитела, и, следовательно, РИБТ становится положительной позже, чем стандартные серореакции и РИФ.

Оценка реакции:

* при иммобилизации до 20% бледных трепонем реакция считается отрицательной;
* при иммобилизации от 21 до 50% бледных трепонем – слабоположительной;
* при иммобилизации от 51 до 100% – положительной.

Положительный результат РИБТ наблюдается у больных с тропическими трепонематозами (пинта, беджель). Иногда РИБТ дает ложноположительный результат при саркоидозе, эритематозе, туберкулезе, циррозе печени, атеросклерозе и др. С возрастом пациентов число ложноположительных результатов РИБТ увеличивается.

Упрощенная методика РИБТ. Пробирки с сыворотками расставляют в штативе. В журнале нечетными номерами отмечают все смесители, в которые добавлялся активный комплемент (опыт), и четными номерами – куда добавлялся инактивированный комплемент (контроль). Комплемент добавляют не для каждой сыворотки отдельно, а готовят «коктейль», т.е. предварительно соединяют комплемент с антигеном в нужных соотношениях для всех сывороток. Взвесь трепонем в питательной среде из расчета по 0,3 мл на каждую сыворотку делят на 2 части и добавляют в один флакон активный комплемент, а в другой - инактивированный.

В стерильный смеситель для лейкоцитов набирают сыворотку до метки 1. Конец смесителя стерильной ваткой вытирают от сыворотки, оставшейся на стенках. Т.к. при попадании положительной сыворотки в антиген в последующих сыворотках могут быть получены неверные результаты. Во избежание загрязнения при больших постановках разливают антиген параллельно в два флакона. После этого набирают взвесь трепонем с активным комплементом до метки 2. В другой смеситель набирают взвесь трепонем с инактивированным комплементом. Оба конца каждого смесителя закрывают резиновым кольцом, как для транспортировки крови, взятой для клинического исследования, и встряхивают для смешивания. Во избежание возможного влияния некоторых сортов резины места ее соприкосновения со смесителем следует смазывать вазелиновым маслом. Можно не закрывать концы смесителя резиновыми кольцами, а заливать их парафином с температурой плавления выше 50°С. Благодаря тому, что оба конца смесителя закрыты, прекращается доступ воздуха, взвесь трепонем находится в относительно анаэробных условиях.

Для контроля набирают в те же смесители все взвеси с активным и инактивированным комплементом, а также одну взвесь без комплемента. Ставят реакцию иммобилизации с сыворотками, заведомо отрицательными и заведомо положительными, оставшимися от прошлой постановки.

Заполненные и закрытые смесители помещают в специальный штатив. На каждый смеситель надевают нумерованные кольца из картона. Смесители помещают в термостат при +35°С на 18‑20 ч. Для регистрации опыта через 18 ч смесители вынимают из термостата попарно - опыт и контроль.

Подсчет подвижных и неподвижных трепонем. По количеству смесителей в штативе расставляют и нумеруют пробирки. Содержимое смесителя выливают в соответствующую нумерованную пробирку, перемешивают тем же смесителем с надетой на него пипеткой и наносят каплю взвеси с активным комплементом на левую сторону предметного стекла, а на правую сторону – с инактивированным комплементом той же сыворотки; посредине стекла ставят номер сыворотки. Капли накрывают покровными стеклами. Капли должны быть небольшими, иначе трепонемы «плывут» с током жидкости, и тогда суждение об их подвижности и подсчет затруднительны. Учет результатов реакции начинают с инактивированного комплемента. Подсчитывают 25 - 30 трепонем и отмечают, какое количество среди них подвижных и какое – неподвижных. Если в контроле содержится меньше 17 подвижных трепонем из 25 сосчитанных, то такой опыт непригоден и его следует повторить. В пробирках с инактивированным комплементом отсутствие подвижности трепонем объясняется не иммобилизацией, а токсичностью сыворотки или недостаточно высоким качеством среды сохранения.

При определении подвижности трепонем следует учесть, что движения трепонем различны. Они могут обладать весьма активной подвижностью, особенно отчетливы сгибательные движения, а иногда отмечаются только винтовые движения. Иногда трепонема лежит как бы неподвижно, но если присмотреться, то видно, что через некоторое время она начинает активно двигаться. Следует также уметь отличать активные движения трепонемы от движения с током жидкости.

В пробирках, в которые вылили содержимое смесителей, в дальнейшем определяют остаточный комплемент (во всех пробирках опыта и контроля). Пробирки с инактивированным комплементом служат как бы контролем для сравнения происшедшего гемолиза.

Расчет специфической иммобилизации производят по следующей формуле:

(Число подвижных трепонем в контроле – число подвижных трепонем в опыте) / Число подвижных трепонем в контроле \* 100.

Реакция иммобилизации считается положительной, когда % иммобилизации выше 51; от 31 до 50% – слабоположительной; сомнительной – от 21 до 30% и отрицательной – ниже 20%.

Опыт с сомнительными, а иногда и слабоположительными результатами следует повторить; при этом можно получить или положительный, или отрицательный результат. Неудовлетворительным считается результат, если имеется большое бактериальное загрязнение или отмечается токсичность сыворотки. Такие исследования следует повторить с новой порцией сыворотки. Целесообразно также подвергать повторному исследованию все сыворотки, давшие полное расхождение со стандартными серологическими реакциями. Эти сыворотки заслуживают особого внимания, так как в таких случаях результаты РИБТ могут дать опору для суждения о наличии или отсутствии сифилиса.

При постановке опыта обращают внимание на соблюдение стерильности и чистоты посуды. Она должна быть свободна от примеси веществ, могущих оказать вредное влияние на жизнеспособность трепонем. Смесители и всю посуду моют сначала холодной водой, затем горячей, споласкивают дистиллированной водой, не применяя никаких дезинфицирующих средств. Смесители стерилизуют в автоклаве, подсушивают в сушильном шкафу.

#### Реакция иммунного прилипания бледных трепонем (РИП)

Основана на том, что вирулентные тканевые трепонемы, сенсибилизированные сывороткой больного сифилисом, в присутствии комплемента и эритроцитов прилипают к поверхности эритроцитов и при центрифугировании увлекаются с ними в осадок, исчезая из надосадочной жидкости.

Для постановки реакции используются: испытуемая сыворотка, антиген, комплемент, эритроциты донора, изотонический раствор натрия хлорида. Кровь берут из вены и обрабатывают, как для реакции Вассермана. Сыворотку крови инактивируют в водяной бане при +55‑56°С в течение 30 мин. В качестве антигена используют взвесь бледных трепонем штамма Никольса.

Техника постановки. Предварительно для реакции разводят все ингредиенты. На дно центрифужной пробирки микропипеткой наливают 0,05 мл испытуемой сыворотки, добавляют 0,35 мл смеси комплемента (0,05 мл) с антигеном (0,3 мл). Пробирки энергично встряхивают в течение 30 сек. и оставляют при комнатной температуре на 30 мин; затем во все пробирки добавляют по 0,1 мл взвеси эритроцитов, пробирки энергично встряхивают в течение 30 сек. и оставляют в термостате при +37°С на 30 мин, после чего все пробирки центрифугируют при 1000 об/мин в течение 3 мин.

Учет результатов проводят путем подсчета бледных трепонем в надосадочной жидкости. Для этого 0,01 мл надосадочной жидкости микропипеткой наносят на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и в темном поле зрения подсчитывают число бледных трепонем в 10 полях зрения. При просмотре препарата под микроскопом учитываются только те бледные трепонемы, которые могут свободно перемещаться с током жидкости. Те же трепонемы, которые попали в поле зрения с током жидкости дополнительно, после начала подсчета («приплывшие»), в этом поле зрения уже не учитываются. Процент прилипания бледных трепонем исчисляется по формуле:

(100 – Оn) /K \* 100,

где On – число бледных трепонем в 10 полях зрения из опытной пробирки;

К – число бледных трепонем в 10 полях зрения из контрольной пробирки.

При иммунном прилипании бледных трепонем, равном 0 - 20%, результат расценивается как отрицательный; 21 - 30% - сомнительный; 31 - 50% - слабоположительный и при 51 - 100% - положительный.

В ответе результат реакции выписывается без указания процента. В случае несовпадения результатов РИП с данными других реакций необходимо провести повторный учет результатов РИП с вновь приготовленным препаратом, повторить постановку реакции с этой же сывороткой крови, при необходимости повторить РИП с сывороткой крови, взятой у обследуемого повторно.

РИП следует применять в следующих случаях: при диагностике тех форм сифилиса, когда на основании данных анамнеза, клиники, результатов КСР и других исследований не удается подтвердить диагноз заболевания; при дифференцировании неспецифических результатов КСР; при контрольном наблюдении после окончания лечения. Специфичность и чувствительность РИП близки РИБТ и РИФ.

#### Реакция гемагглютинации с бледными трепонемами (ТРПГА)

Принцип метода заключается в следующем: формалинизированные тонизированные бараньи эритроциты соединяются с экстрактом из патогенных бледных трепонем. Образующийся комплекс, который фиксируется на эритроцитах, составляет корпускулярный антиген. При соединении антигена с сывороткой, содержащей гомологичные антитела, образуется иммунный комплекс, который вызывает агглютинацию эритроцитов.

Предварительный результат может быть зарегистрирован после инкубации в течение 3 - 4 ч. Появление равномерной розовой окраски указывает на положительный результат, а агглютинат (преципитат) темно-красного цвета в виде пятна или кольца является показателем осаждения эритроцитов. ТРПГА-тест, выполняемый вручную или автоматизированным методом, является специфичным и чувствительным тестом.

#### Реакция микрогемагглютинации с бледными трепонемами (МНА‑ТР)

Является вариантом ТРПГА. Ее ставят на пластинках для микротитрования. Она требует по сравнению с ТРПГА меньшего количества сыворотки, адсорбирующего разбавителя и антигена. Окончательный результат получают после 4 ч инкубирования сыворотки. Автоматизированная реакция микрогемагглютинации с бледными трепонемами (АМНА-ТР) благодаря автоматизации процессов заполнения тест-пластин и разведения сыворотки проще и обходится дешевле, чем реакция АМН-ТР. Пригодна при массовых обследованиях на сифилис.

## Клиническая оценка результатов серологических реакций

При первичном серонегативном периоде сифилиса бывают положительными РИФ и реакция Колмера как наиболее чувствительные серореакции. Однако это не является основанием для постановки таким больным диагноза первичного серопозитивного сифилиса. У ряда больных в этом периоде бывает изолированный положительный результат при постановке реакции Вассермана с трепонемными или с кардиолипиновым антигенами. В конце 3-й или в течение 4-й недели после появления первичной сифиломы становятся положительными стандартные серологические реакции - с этого момента начинается первичный серопозитивный период сифилиса. На 1 – 2-й неделе первичного серопозитивного сифилиса отмечается увеличение степени позитивности серореакции (1+, 2+, 3+) и нарастание титра реагинов (1:5, 1:10, 1:20). РИФ и реакция Колмера у всех больных дают резко положительный результат, но РИБТ отрицательная или процент иммобилизации очень низок. Диагноз первичного серопозитивного сифилиса ставится тем больным, у которых осадочные реакции и реакция Вассермана с неспецифическими антигенами дали однократный слабоположительный результат. При дальнейшем течении первичного сифилиса все серологические реакции становятся резко положительными (4+); титр реагинов достигает 1:80, 1:160, РИФ продолжает быть резко положительной, но РИБТ у большинства больных еще остается отрицательной или может стать слабоположительной.

При вторичном свежем сифилисе резко положительный результат по всем стандартным серологическим реакциям наблюдается почти в 100% наблюдений; титр реагинов наиболее высок - 1:160; 1:240 или 1:320. РИФ - 4+; РИБТ дает положительнй результат более чем у половины больных, однако процент иммобилизации трепонем невысок (40 - 60%).

При вторичном рецидивном сифилисе положительный результат по стандартным серологическим реакциям отмечается в 96 - 98%. Отрицательные результаты объясняются малосимптомным рецидивным течением, наличием астенизации, сочетанием сифилиса и ВИЧ-инфекции. РИБТ дает положительный результат у 85 - 90% больных при выраженной степени иммобилизации: 80 – 90 - 100%.

Третичный сифилис характеризуется положительными результатами по стандартным серологическим реакциям в 50 - 90% наблюдений и положительной РИБТ у 92 - 100% пациентов с высоким процентом иммобилизации.

Диагноз скрытого серопозитивного сифилиса устанавливают только по положительным серореакциям в крови с обязательным подтверждением их по РИБТ, т.к. только РИБТ (в меньшей степени РИФ) позволяет отдифференцировать ложноположительные серореакции (даже с позитивностью в 2+ или 3+) от истинно положительных.

Разные формы сифилиса нервной системы и висцерального сифилиса имеют различную частоту и выразительность стандартных серореакции. Так, прогрессивный паралич в 100% случаев сопровождается резко положительными всеми стандартными серологическими реакциями. Сифилис сосудов мозга, спинная сухотка, сифилитическое поражение сердечнососудистой системы сопровождаются положительными серореакциями лишь в 40‑50‑60%. Однако РИБТ почти при всех перечисленных патологических состояниях дает резко положительный результат (90 - 100% иммобилизации).

При диагностировании врожденного сифилиса в первые 2 мес. после рождения стандартные серологические реакции у ребенка не определяют, т.к. они могут быть положительными за счет пассивной передачи реагинов через плаценту. По этой же причине не имеет значение и положительный результат РИБТ. Пассивно переданные от матери ребенку имобилизины самопроизвольно исчезают в течение 6 мес. после рождения. Если ребенок инфицируется незадолго до родов, то в этом случае РИБТ будет еще отрицательной, несмотря на наличие в организме ребенка сифилитической инфекции.

При врожденном сифилисе детей грудного возраста с активными проявлениями стандартные серореакции могут быть отрицательными в 1% наблюдений.

При врожденном сифилисе раннего детского возраста отрицательные стандартные серореакции варьируют от 15 до 20%, но в этих случаях РИБТ дает положительные данные у 90 - 98% детей.

При позднем врожденном сифилисе при наличии активных проявлений стандартные серореакции констатируются лишь у 70 - 80% обследованных, но РИБТ четко положительная у 100% больных с высоким титром иммобилизинов.

## Современные усовершенствованные серореакции с использованием принципов иммуноферментных констант

Несмотря на значительное количество тестов для серодиагностики сифилиса, их высокую чувствительность и специфичность имеется ряд состояний при которых данные серодиагностики требуют проверки и дополнительных исследований. Например, у пациентов, полноценно леченных по поводу сифилиса, иногда длительное время остаются положительными серореакции. Это объясняется состоянием серорезистентности, которое до настоящего времени не получило научной трактовки. Затрудняется также дифференциальная диагностика неведомого сифилиса от рецидива процесса и реинфекции. С целью разработки информативных вариантов серореакции были использованы детали антителообразования у больных сифилисом, с предложением и исследованием вариантов серореакции: метод иммуноферментного анализа (ИФА), метод иммуноблоттинга (IgM‑серология), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

### Иммуноферментный анализ

Широко используется для диагностики сифилиса. Принцип реакции заключается в соединении сифилитического антигена, сорбированного на поверхности твердофазного носителя, с антителом испытуемой сыворотки крови и выявления специфического комплекса антиген-антитело с помощью антивидовой иммунной сыворотки, меченной ферментом. Взаимодействие фермента с субстратом дает цветную реакцию, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител.

Тест для выявления IgG - тест-ловушка использует в качестве антигена очищенные патогенные трепонемы. У больных с вторичным, ранним и поздним сифилисом и нейросифилисом и у реинфицированных пациентов чувствительность теста 100%. Тот же принцип ловушки для антител применен с целью определения сывороточных IgM.

### Метод иммуноблоттинга

При проведении иммуноблоттинга трепонемы подвергаются электрофорезу с разделением белковых иммунодерминант на нитроцеллюлозе. Затем производится обработка разделенных точек исследуемой сыворотки и антителами к IgG либо IgM, меченными ферментами или радиоактивными веществами.

lgM‑серология.

При изучении антителообразования в организме больных сифилисом установлено, что первыми после заражения вырабатываются специфические IgM, выявляемые уже на 2-й нед. после заражения и достигающие максимальной концентрации в крови на 6 - 9 нед. Через 6 мес. после окончания терапии у большинства больных в крови они не определяются, На 4-й нед. после инфицирования организм начинает продуцировать специфические IgG. Этот вид иммуноглобулинов в наибольшем количестве определяется через 1 - 2 года после заражения. Заслуживает особого внимания то, что специфические IgM перестают вырабатываться при исчезновении из организма антигена, а секреция IgG продолжается клонами клеток памяти. Кроме того, крупные молекулы IgM не проходят через плаценту от матери к плоду, в связи с чем по их наличию у ребенка судят об его инфицировании бледной трепонемой.

Ввиду того, что концентрация в крови специфических IgM закономерно снижается после эффективного лечения, рост титра этих антител может служить вспомогательным признаком наличия рецидива заболевания или реинфекции.

### Полимеразно цепная реакция (ПЦР)

Метод заключается в многократном увеличении (амплификации) количества ДНК выявляемого микроорганизма. Разработка вариантов ПЦР для диагностики сифилиса обусловлена недостаточностью стандартных тестов при раннем серонегативном, врожденном сифилисе и нейросифилисе. ПЦР является превосходным методом для диагностики сифилиса при небольшом количестве трепонем в исследуемом материале. Достоинством ПЦР является возможность автоматизации реакции путем заданного циклического температурного режима для определяемой за счет меченных праймеров цветной реакции. Остается невыясненным вопрос – отражает ли наличие трепонемной ДНК присутствие жизнеспособных трепонем или это могут быть остатки погибших микроорганизмов, содержащие способную к амплификации ДНК.

Применение ПЦР может иметь большое значение при диагностике врожденного сифилиса, нейросифилиса, первичного серонегативного сифилиса, а также у больных, у которых диагностика сифилиса с помощью обычных серологических реакций затруднена из-за инфицирования ВИЧ.

## Исследование спинномозговой жидкости

Особое внимание уделяется исследованию спинномозговой жидкости для определения пораженности сифилисом нервной системы, как критерий качества лечения у лиц с патологическими изменениями в ликворе до начала лечения и как один из критериев излеченности больных.

Ликвор получают при люмбальной пункции. В пробирку собирают 7 - 8 мл (но не более 10 мл) ликвора. Это количество распределяют в две пробирки, одну из которых направляют в клиническую лабораторию, а другую – в серологическую.

В клинической лаборатории исследуют цитоз, содержание белка, глобулиновые реакции Панди и Нонне-Апельта. Минимальные патологические изменения в спинномозговой жидкости следующие: содержание белка, начиная с 0,4%, цитоз - 8 клеток в 1 мкл, глобулиновые реакции (реакция Нонне-Апельта++, реакция Панди+++; реакция Ланге - больше 2-х 2-ек в цифровом значении, положительная РВ). Показатели выше указанных, будучи изолированными, свидетельствуют о выраженных патологических изменениях в спинномозговой жидкости. Патологической считается также ликвор, в котором несколько показателей изменены соответственно данным минимальной патологии, а РВ положительна. Концентрация белка в ликворе свыше 400 мг/л и число клеток более 5000 на 1 л свидетельствуют о воспалительном процессе в ЦНС. Для обозначения позитивности глобулиновых реакций и РВ применяется система четырех плюсов; резко положительный результат (4+), положительный - 3+, слабоположительный - 2+ и сомнительный - 1+.

В серологической лаборатории ставятся РВ, реакция Ланге с коллоидным золотом, РИТ, РИФ, РИФ-ц, ТРНА, либо FTAABS, либо IgM TPHA. Отрицательная ТРНА, либо FTAABS исключает нейросифилис. Положительная IgM TPHA со спинномозговой жидкостью и индекс ТРНА свыше 10 подтверждают наличие сифилитического процесса в ЦНС. Использование РИФ целесообразно при ликвородиагностике сифилиса. Особенно высокочувствителен и специфичен тест с цельным ликвором (РИФ-ц). Применение РИФ РИБТ и IgM ТРНА расширяет возможности выявления сифилитического поражения нервной системы.

При ранних формах нейросифилиса более выражены количественные отклонения цитоза, концентрации белка, сочетающиеся с минимальной патологией коллоидной реакции. Тяжелые паренхиматозные сифилитические поражения головного и спинного мозга сопровождаются выраженными изменениями коллоидных реакций до пяти или шести «шестерок» в реакции Ланге. Реакция Вассермана в спинномозговой жидкости иногда может быть ложноотрицательной или ложноположительный. Положительные неспецифические данные реакции Вассермана в спинномозговой жидкости могут наблюдаться при опухолях мозга, эхинококкозе, цистицеркозе, рассеянном склерозе и паркинсонизме.

**2 Гонорея**

Гонорея – венерическое заболевание, передаваемое в основном при интимных контактах, вызываемое гонококком.

## Морфология, устойчивость и культуральные свойства гонококков

Возбудитель грамотрицательный диплококк, адсорбирующийся на поверхности эпителиальных клеток, способный проникать в межклеточные щели с образованием микроколоний, защищенных от воздействия антител и клеточных факторов иммунитета. Характерно внутриклеточное расположение возбудителей в сегментоядерных лейкоцитах на всех стадиях процесса, особенно при обильном гнойном отделяемом. Эндоцитобиоз – внутриклеточная персистенция гонококков позволяет оставаться недоступными действию антибиотиков. В организме больных гонококки претерпевают L‑трансформацию после применения химиотерапевтических средств или при хроническом течении заболевания.

На ультратонких срезах у гонококков выявляются клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма с множественными рибосомами, многочисленными полирибосомами, лизосомами и нуклеоид с нитями ДНК. На поверхности гонококков выявляются тонкие трубчатые нити – пили. Им приписывают способность гонококков передавать генетические свойства, в частности, устойчивость к антибиотикам, способность прилипать к клеткам эпителия хозяина и ряд других биологических особенностей. С пилями, по-видимому, связан механизм передачи генетической информации к способности переноса плазмид и β-лактамазопродуцирующих штаммов гонококков. Устойчивость β-лактамазопродуцирующих гонококков к антибиотикам обусловлена полиантибиотикорезистентностью, и такими адаптационными механизмами как L-трансформация, образование спороподобных форм и др.. Помимо штаммов, образующих β-лактамазопродуцируюших клонов гонококков, существуют штаммы трансформирующиеся в L-формы. Для начальной стадии L-трансформации характерен множественный нуклеоид с последующим истончением наружной стенки, потерей ее структуры и фестончатости. L-трансформация может происходить спонтанно или при действии антибиотиков. После прекращения действия препарата, вызвавшего образование L-форм, наступает реверсия. При L‑трансформации между наружной стенкой и цитоплазматической мембраной образуются элементарные тельца – округлые образования разной величины, из которых образуются типичные гонококки. Именно биологическое свойство образовывать нестабильные варианты L-форм рассматривается как одна из наиболее частых причин рецидивов болезни. Отдельные штаммы гонококков вырабатывают фермент пенициллиназу, что объясняет их устойчивость к пенициллину и его дериватам.

## 2.2 Формы гонорейной инфекции

Патологический процесс чаще ограничивается местом первоначального внедрения возбудителя. В связи с этим принято различать гонорею:

* мочеполовых органов (генитальная),
* экстрагенитальную (гонорея прямой кишки, глотки, рта, миндалин, глаз)
* метастатическую (диссеминированная), являющуюся осложнением двух первых.

## 2.3 Диагностика гонококковой инфекции

В диагностике гонореи решающее значение имеют лабораторные данные. Этиологическая диагностика проводится с использованием бактериоскопических и бактериологических методов. Если в препарате при бактериоскопии обнаружены типичные гонококки, то культуральное исследование не проводится. Топическая диагностика применяется обязательно для точного определения локализации воспалительного процесса в уретре с помощью двухстаканной пробы. Более точная топическая диагностика осуществляется методом уретроскопии, но этот способ исследования рекомендуется применять только при хронической форме процесса, так как при острой форме данная процедура может способствовать распространению инфекции в вышележащие отделы мочеполовой системы.

Методы лабораторной диагностики гонококковой инфекции:

* микроскопические (бактериоскопические),
* культуральные (бактериологические).
* молекулярно-биологические.

### 2.3.1 Микроскопические методы исследования

В случае если нефиксированный препарат доставляется в лабораторию: препарат фиксируют 960 спиртом или трехкратным проведением стекла через пламя горелки.

Хранение мазков:

Фиксированные препараты можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких дней.

#### Окраска метиленовым синим:

Окраска метиленовым синим является ориентировочной и позволяет оценить морфологию и расположение микроорганизмов в мазке. Можно использовать водный или спиртовой растворы метиленового синего. Использование спиртового раствора позволяет сократить время фиксации препарата, не снижал качества окраски.

#### Окраска по методу Грама:

При окраске по методу Грама в препарате выявляются тинкториальные свойства бактерий. В зависимости от химической структуры клеточной стенки (наличие или отсутствие тейхоевых кислот) бактерии либо обладают способностью удерживать комплекс кристаллического фиолетового с йодом и устойчивы к обесцвечиванию спиртом (грамположительные), либо нет (грамотрицательные).

#### Микроскопия окрашенных препаратов.

При проведении микроскопического исследования последовательно оцениваются препараты, окрашенные двумя способами: метиленовым синим и по Граму. Нельзя выносить заключение по результатам просмотра лишь одного препарата.

Окраска метиленовым синим позволяет сделать заключение о наличии воспаления и выявлении морфотипа бактерий. При окраске по Граму возможно выявление грамотрицательных диплококков. При микроскопии препаратов врачом-лаборантом оценивается наличие эпителия, количество лейкоцитов, эритроцитов, морфотип бактерий (лактобациллы, кокки, коккобациллы), наличие вне- и внутриклеточно расположенных диплококков.

Мазки, окрашенные метиленовым синим или по Граму, оцениваются при двух увеличениях (с применением объективов xl0, х100, т.е. при увеличении соответственно в 100 и 1000 раз). Микроскопическое исследование следует начинать с малого увеличения (х100), позволяющего обнаружить клинический материал на стекле, оценить адекватность взятия из соответствующего анатомического участка, определить наличие «загрязнений» из других анатомических участков, выбрать участок препарата для дальнейшего исследования при большом увеличении (х1000). Микроскопия при большом увеличении позволяет выявить и оценить воспалительную реакцию и наличие микроорганизмов. При увеличении xl000 с иммерсией подсчет лейкоцитов следует проводить в пяти полях зрения. При этом особое внимание следует уделить поиску внутриклеточных диплококков в лейкоцитах.

Диагноз уретрита у мужчин устанавливается на основании обнаружения 4 и более лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении xl000. При наличии цервицита количество полиморфно ядерных лейкоцитов повышено (более 10 при увеличении х1000). При клиническом исследовании следует принимать во внимание наличие или отсутствие слизисто-гнойных цервикальных выделений (зеленовато-желтый гной со слизью на белом ватном тампоне).

При исследовании вагинального мазка у женщин нужно помнить о том, что число лейкоцитов зависит от индивидуальных особенностей организма - от дня менструального цикла, наличия внутриматочной спирали и т.д. Поэтому для диагностикки слизисто-гнойного цервицита рекомендуется использовать оба критерия, т.е. наличие клинических проявлений и воспалительный характер цервикального мазка.

Диагноз уретрита у женщин подтверждается нахождением более 10 лейкоцитов в поле зрения при увеличении микроскопах 1000, Следует помнить, что если во влагалище и/или шейке матки имеется патологический воспалительный процесс и при этом наблюдаются выделения из влагалища, уретральный мазок всегда загрязнён материалом этих выделений (клетки плоского эпителия, лейкоциты, вагинальная микрофлора) и не годится для дальнейшей оценки, поскольку он не имеет ничего общего с уретрой.

#### Оценка результатов микроскопии окрашенных мазков.

На основании микроскопического исследования диагноз гонореи устанавливается по трем признакам гонококка:

* его форме;
* расположению;
* окраске.

Если же отсутствует хотя бы один из них, требуется культуральное исследование.

Решающее значение при микроскопической диагностике гонореи имеет учет расположения диплококков. Гонококки в основном располагаются внутри лейкоцитов и эпителиальных клеток. На основании обнаружения диплококков, расположенных вне клеток, микроскопический диагноз гонореи не ставится, требуется культуральное исследование.

Окраска гонококков (по методу Грама) - красно розовая(грамотрицательный диплококк). При этом ядра лейкоцитов и эпителиальных клеток окрашиваются т фиолетовый цвет.

Оценка мазков, окрашенных метиленовым синим

При микроскопии препарата видны:

* ядра клеток, окрашенные в синий цвет;
* цитоплазма, окрашенная в голубой цвет разной интенсивности;
* бактериальная микрофлора, окрашенная в синий цвет разной интенсивности.

Окраска метиленовым синим является ориентировочной и позволяет оценить морфологию (форму) и расположение микроорганизмов в мазке (внутри лейкоцита и на эпителиальных клетках).

Оценка мазков, окрашенных по Граму

Методика оценки мазка, окрашенного по Граму, принципиально не отличается от методики оценки мазка, окрашенного метиленовым синим. Окраска по Граму позволяет выделять в картине мазка красно-розовые (грамотрицателъные) или сине-фиолетовые (грамположительиые) элементы. Основной целью исследования является выявление грамотрицательных диплококков со специфической морфологией, а также степени выраженности лейкоцитарной реакции.

### 2.3.2 Культуральное (бактериологическое) исследование

Дополнительно к микроскопии окрашенных мазков бактериологическое исследование на гонорею должно всегда проводиться при обследовании:

* детей, так как у них встречается большое количество непатогенных нейссерий. особенно в полости рта, глотки и гениталиях;
* женщин, так как диагностическая чувствительность микроскопии генитальных мазков женщин низкая;
* пациентов с бессимптомной и экстрагекитальной гонореей (глотки, прямой кишки, конъюнктивы и др.);
* сексуальных контактов пациентов с доказанной гонореей (где при микроскопии не удалось выявить возбудителя);
* пациентов с гонореей после окончания лечения(не раньше 10 дней) и при снятии их с учета;
* с целью окончательной идентификации нейссерий;
* для определения чувствительности нейссерий к антибиотикам;
* в случае если будет проводиться фенотипическая и/или генотипическая диагностикаN. gonorrhoeae;
* в случае сексуального насилия, при запросе следственных органов и/или судебно-медицинских экспертов.

Ответ по результатам посева при выделении чистой культуры и её идентификации выдаётся через 5 дней после взятия пробы.

#### Проведение бактериологического анализа

Подученный биологический материал необходимо сразу же поместить одновременно на селективную и неселективную питательную среду, поскольку некоторые штаммы гонококков чувствительны к концентрациям ванкомицина и триметоприма, входящих в состав селективной среды.

Культивирование гонококков следует проводить на чашках Петри диаметром 90 мм с количеством среды не менее 20 мл на чашку или 100 мм с количеством среды 26 мл. После приготовления чашек со средой они ставятся в термостат при 36±1°С на 1 час для удаления конденсата (излишней влажности). Пересушивание среды недопустимо, т.к. это отразится на качестве роста гонококков. Перед проведением посева чашки необходимо прогреть в термостате при температуре +36±1°С в течение 30 минут.

Клинический материал от каждого пациента должен засеваться на отдельную чашку Петри. При использовании больших чашек (90 или 100 мм) материал из уретры и цервикального канала у женщин может засеваться на одну чашку Петри в разные ее секторы с соответствующей маркировкой. Материал из уретры мужчин должен засеваться на отдельную чашку.

Взятый материал тампоном наносится на поверхность. Затем стерильной бактериологической петлей материал распределяется по площади поверхности питательной среды штриховыми движениями в 3 - 4 разных на правлениях с целью создания условий для роста отдельно расположенных колоний гонококков. Чашки немедленно помещаются в анаэростат с содержанием СО2 5±2%. влажностью 70%, который ставится в термостат с контролируемой температурой 36±10С. Допускается использование эксикатора, который ставится в термостат с контролируемой температурой 36±10С, в эксикаторе создаются условия повышенного содержания СО2 при помощи свечении газогенерирующих пакетов и влажности. Чашки просматриваются через 18 - 24 часа инкубации, в случае отсутствия роста - через 48 часов:

* При отсутствии признаков роста через 72 часа инкубации наблюдение прекращают.
* При выявлении характерных колоний проводится первичная и видовая идентификация.

#### Идентификация нейссерии

Первичная идентификация нейссерии проводится путем:

* визуальной оценки вида колоний,
* окраски материала подозрительных колоний по Граму;
* оксидазного теста.

#### Оценка вида колоний

Типичные колонии гонококков через 18 - 24 часа инкубации выпуклые прозрачные серо-белого цвета, имеют диаметр 0,5 - 1,0 мм. При дальнейшей инкубации колонии могут увеличиваться в размерах до 3,0 мм и уплощаться. Нередко на одной чашке можно встретить колонии разного вида.

Большие трудности возникают при идеитификации колоний гонококка в посевах из ротоглотки, т.к. при этом часто вырастают менингококки и непатогенные нейссерии, колонии которых сходны с колониями гонококков. Колонии менингококка выглядят голубоватыми, колонии непатогенных нейссерии - беловатыми, а гонококков - бесцветными, слизистыми. Размер, цвет, морфология и консистенция колоний могут варьировать в зависимости от применяемой питательной среды. Идентифицировать возбудителя можно только при определении сахаролитических свойств культур или другими тестами, подтверждающими видовую принадлежность микроорганизма.

### Применение оксидазного теста

Обнаружение оксидазоположительных грамотрицательных диплококков считается достаточным для их идентификации как N. gonorrhoeae при рутинной диагностике. Для определения цитохром-с оксидазы можно использовать один из рекомендованных методов:

* На подозрительную колонию наносится капля оксидазного реагента {тетраметилфенилендиамина, 1%-ный водный раствор). Быстрое изменение цвета реагента, в течение 5 - 10 секунд, на сине-фиолетовый и его сохранение дольше 30 секунд позволяет считать тест положительным. Реагент, используемый в оксидазном тесте, убивает гонококки, поэтому дальнейшая работа с этими колониями будет невозможна.
* Полоска фильтровальной бумаги смачивается несколькими каплями реагента, затем на нее помещается бактериологической петлей материал из подозрительной колонии. Этот способ позволяет сохранить материал на чашке для проведения дальнейших исследований. Высокая чувствительность оксидазного теста не согласуется с его специфичностыо. Оксидазоположительными могут быть и другие бактерии, выделяющие цитохромную оксидазу, поэтому оксидазоположнтельные колонии микроорганизмов обязательно нужно исследовать микроскопически с окраской по Граму.
* Имеются коммерческие диски и полоски, содержащие диметил-р-фенилендиамина гидрохлорид. Платиновой петлей или стерильной стеклянной палочкой испытуемую культуру наносят на диск, предварительно слегка смоченный дистиллированной водой.

Учет результата

Темно-лиловое или синее окрашивание, появляющееся через 10 - 30 секунд, свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Отсутствие изменения цвета - об отсутствии данного фермента.

При исследовании мазков, окрашенных по Граму, из культур учитываются морфология, расположение и окраска гонококков. После 18 - 24 часов культивирования гонококки представляют собой скопления грамотрицательных кокков и диплококков, имеющих более компактное расположение микроорганизмов в центре и разреженное и неравномерное распределение по периферии.

Наряду с интенсивно окрашенными в розово-красный цвет кокками встречаются и бледно-окрашенные формы. Более старые культуры (48 часов и более) трудно интерпретировать, т.к. отмечается большое количество полностью лизированных клеток. По мере старения культуры увеличивается полиморфность гонококков.

Для подтверждающей идентификации нейссерий используются тесты:

* изучение ферментативной активности;
* иммунологические тесты (прямая иммунофлюоресценция, коагглютинация);
* молекулярно-биологические методы (ПЦР).

#### Изучение ферментативной активности

Ферментативная активность Neis. gonorrеаеизучается в реакции окисления сахаров. Реакция может быть ложноположительной из-за контаминации исследуемых культур гонококков другими бактериями и ложноотрицательной при использовании гонококков, культивируемых более 24 часов (вследствие аутолиза микроорганизмов). Для предупреждения этих возможных факторов необходимо выделить чистую культуру гонококков путем пересева типичных колоний на чашки Петри с неселективной средой (шоколадный агар). Инкубация проводится в течение 18 - 24 часов.

Изучение ферментативной активности Neis. gonorrhoeaeможет проводиться в ростозависимых и ростонезависимых тестах. При проведении ростозависимых тестов сахара и другие субстраты (например, феноловый красный) вводятся непосредственно в питательную среду, на которой осуществляется рост гонококка. Однако в настоящее время эти тесты не могут быть рекомендованы, т.к. широко используемые ростонезависимые тесты дают возможность получить более быстрый (в течение нескольких часов) и специфический результат, позволяя идентифицировать исключительно Neis. gonorrhoeaeи исключить другие непатогенные нейссерий. Существуют коммерческие наборы для изучения ферментативной активности Neis. gonorrhoeae.

Оценка проводится по изменению цвета среды: при ферментации сахаров - от красного к желтому (результат положительный). Энзимсубстратные тесты с использованием ферментов (орто-нитрофенил-бета-галактозидаза (ONPG), гамма-глютамил аминопептидаза (GLU-AMP), гидроксипролил аминосинтидаза (PIP), гидроксипролин аминопептидаза (НРА), пролин аминопептидаза (Рго-АР)) предназначены для быстрой дифференциации между N. gonorrhoeae, N. meningitidis, N. tacarnicaи некоторыми штаммами N. cinerea и N. Catarrhalis. Результаты теста считаются положительными, если происходит изменение цвета среды - от бесцветного к желтому для ОФГ и от светло-желтого к интенсивно оранжевому для Глю-АП и Про-АЛ. Однако чувствительность и специфичиость этих быстрых энзимсубстратных тестов оказались неоптимальными.

Проведение видовой идентификации возможно также с использованием бактериологических анализаторов и коммерческих наборов реагентов.

#### Иммунологические/антигенные подтверждающие тесты

Иммунологические тесты рекомендуется использовать только в референс-лабораториях для окончательного подтверждения *N. gonorrhoeae.*

Иммунологические тесты с использованием моноклональных антител для прямой иммунофлюоресценции (ПИФ), коагглютинации и иммуноферментного анализа являются высокочувствительными и специфичными для точной идентификации N. gon*orrhoeae.* Эти тесты могут проводиться с культурой нейссерий, выделенных при первичном посеве. При этом не требуется выделение чистой культуры гонококков, и изоляты могут быть идентифицированы на18 - 24 часа раньше, чем при изучении ферментативной активности N. *gonorrhoea.* Однако эти тесты дороже, чем ферментативные, коммерческие тест системы имеют меньший срок годности.

#### Прямая иммунофлюоресценция

Тест основан на использовании флюоресцирующих моноклональных антител против очищенного РroВ белка наружной мембраны гонококка, ранее называвшегося 1 или главный белок наружной мембраны гонококка. Очень важно строгое следование инструкции производителя каждого отдельного теста.

### Молекулярно-биологические методы

Для выявления N. gonorrhoeaeмогут быть использованы ДНК/РНК методы, такие как полимеразно цепная реакция (ПЦР), а также методы, основанные на гибридизации. Однако результаты, полученные при использовании этих методов, должны оцениваться в связи с клинической ситуацией, т.к. после проведенного лечения гонореи в некоторых случаяхДНК может определяться в образцах до 2 - 3 недель после лечения.

Однако с целью получения живого микроорганизма и для определения чувствительности к антибиотикам проведение бактериологического исследования является необходимым у пациентов с клинической симптоматикой. В некоторых ситуациях молекулярно-биологические методы являются более чувствительными, чем культурадьный метод. Чувствительность культурального метода во многом определяется качеством питательной среды и условий транспортирования образца в лабораторию. При соблюдении условий транспортировки клинического материала в лабораторию, использовании качественных питательных сред, строгого проведения условий лабораторного исследования бактериаюгнческое исследование является методом выбора, и наоборот. Следовательно, выбор молекулярно-биологического или культурального метода зависит от организационных условий и качества проведения лабораторного исследования, а также от зпидемиологической ситуации в популяции. В популяции с повышенным риском распространения заболевания бактериологическое исследование является методом выбора. В популяции низкого риска, для скрининга и для исследования неинвазивных образцов, молекулярно-биологические методы подходят больше (к примеру, исследование мочи у мужчин и вагинальных образцов у женщин). Однако если метод используется для исследования популяции низкого риска и он не является высоко специфичным, возможно получение большого количества ложноположительных результатов. Молекулярно-биологические методы являются оптимальными для исследования образцов, полученных неинвазивным способом, но их чувствительность и специфичность вариабельны. Чувствительность молекулярно-биологических методов выше при исследовании образцов мочи у мужчин, по сравнению с женскими образцами. Оптимальным для женщин является исследование вагинальных материалов.

При исследовании пациентов без клинических симптомов заболевания молекулярно-биологические методы обязательно должны подтверждаться бактериологическим методом. Пока еще нет лицензированных молекулярно-биологических методов для исследования ректальных или фарингеальных образцов. ДНК/РНК-методы могут быть использованы для видового подтверждения N.gonorrhoeaeиз культур. Для этой цели материал, собранный петлей из специфической колонки, может быть перенесен в пробирку типа Эппендорф или любую другую пробирку со 100 мкл забуференного физиологического раствора. Однако этот тест не исключает необходимости предварительной идентификации N. gonorrhoeae.

Для проведения молекулярно-биологических методов из клинического образца необходимо выделить ДНК в соответствии с инструкцией изготовителя. Методы предназначаются для обнаружения N. gonorrhoeae в урогенитальных пробах. В большинстве случаев молекулярно-биологические методы имеют высокую чувствительность и специфичность. Однако наличие субстанций ингибиторов в некоторых образцах, а также тот факт, что у некоторых штаммов N. gonorrhoeae может не быть последовательности, являющейся мишенью для молекулярно-биологического метода, может приводить к снижению чувствительности метода. Известна недостаточная специфичность некоторых ДНК/РНК-методов, и получено большое количество ложноположительных результатов из-за перекрестных реакций с комменсальными видами нейссерий. таких как N. lactamlса, N. cinerea. N subjtava. Высокую специфичность показали новые методы ПЦР-анализа. использующие праймеры, направленные на РогА псевдоген N. gonorrhoeae.Этот ген (PorAJ/псевдо-ген подходит для дифференциальной диагностики N. gonorrhoeae и N. meningitides**.** Для всех экстрагенитальных образцов или для определения антибиотикочувствительности должно проводиться культивирование с последующей идентификацией нейссерий до вида.

#### Проведение анализа

Выделение ДНК и проведшие амплификации проводится строго в соответствии с инструкцией производителя диагностических наборов. Необходимо строгое соблюдение инструкций по уборке помещений и обработке поверхностей. После окончания работы рабочие поверхности должны обрабатываться ДНК/РНК деградирующими растворами для удаления ранее амплифицированных нуклеиновых кислот.

#### Интерпретация результатов

Разработка и внедрение диагностических методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, позволяют улучшить диагностику гонореи, так же как и многих других инфекционных болезней. Однако особое внимание следует уделять правильной интерпретации результатов молекулярно-биологических тестов, даже если они имеют хорошие диагностические характеристики. Это особенно важно в случае применения этих методов для скрининга гонореи в популяциях с низкой распространенностью инфекции.

### 2.3.4 Лабораторные критерии диагноза гонореи;

* выделение Neisseria gonorrhoeaeиз клинического образца;
* выявление антигена или нуклеиновой кисло ты N. gonorrhoeae:
* обнаружение грамотрицательных внутриклеточных диплококков в мазках из уретры мужчин.

# **Лабораторная диагностика урогенитального хламидиоза**

## 

## Морфология, устойчивость и культуральные свойства хламидий

Хламидии (Chlamydia trachomatis) являются мелкими грамотрицательными микроорганизмами. Хламидии составляют группу облигатных внутриклеточных паразитов, не могут размножаться вне клетки хозяина. Наибольший тропизм хламидии проявляют к клеткам цилиндрического эпителия. Цикл развития хламидии включает две формы существования микроорганизма: элементарные тельца (ЭТ) - мелкие (0,15 – 0,2 мкм) неподвижные сферические организмы и ретикулярные (инициальные) тельца (РТ) - более крупные (около 1 мкм). ЭТ представляет собой высоко инфекционную форму возбудителя, адаптированную к внеклеточному существованию. ЭТ адсорбируется на поверхность эпителиальной клетки при помощи специфического поверхностного термолабильного эффектора, структурно связанного с типоспецифическим хламидийным антигеном и комплементарного клеточному рецептору, содержащему сиаловую кислоту. Последняя разрушается нейраминидазой и ЭТ проникает в клетку. Хламидии не имеют активного механизма проникновения в чувствительную клетку. Проникновение ЭТ осуществляется посредством фагоцитарной активности клеток, при этом происходит ингибирование процесса слияния фагосомы, в которой они находятся, с лизосомами и тем самым “выключают” важнейший защитный клеточный механизм.

В клетке начинается процесс деления ЭТ: увеличивается количество рибосом и полирибосом, визуализируется бактериальный нуклеоид, они увеличиваются в размере, появляются формы бинарного деления, формируется РТ, которое далее распадается на ЭТ. Из одного ЭТ образуется от 200 до 1000 новых “инфекционных единиц”, новых ЭТ. Обычно этот процесс длится 18 - 24 часа. Все это время возбудитель персистирует в фагосоме пораженной клетки. Вновь образовавшиеся ЭТ покидают клетку хозяина при ее разрушении, либо путем экзоцитоза, окруженные тонким ободком цитоплазмы. В последнем случае жизнеспособность клетки сохраняется. Предполагается, что данный механизм высвобождения ЭТ является одним из факторов бессимптомного и латентного течения хламидийной инфекции.

Вновь образовавшиеся ЭТ после выхода из пораженной клетки могут инфицировать новые здоровые клетки, что приводит к прогрессированию инфекционного процесса. Длительность инкубационного периода зависит от состояния организма, инфицирующей дозы, локуса поражения и может составлять в среднем от 14 до 35 дней.

В настоящее время различают по антигенной структуре 15 серотипов патогенных штаммов С. trachomatis. Так называемые “глазные” штаммы по эпидемическим особенностям и клиническим проявлениям хламидийной инфекции отличаются от “генитальных” штаммов. Первые (4 серовара С. trachomatis: А, В, Ва, С) вызывают классическую эндемическую трахому, передаются из глаз больного в глаза здорового контактным путем. Вторые (серовары от D до К) поражают отделы урогенитального тракта и передаются половым путем. Возможно инфицирование глаз “генитальными” штаммами хламидий у взрослых и детей при заносе инфицированного материала руками, полотенцами и другими бытовыми предметами, при купании, особенно в бассейнах, а также у новорожденных во время родов при прохождении через родовые пути инфицированной матери.

С.trachomatis различных серотипов имеют общий групповой, родоспецифический антиген - липополисахаридный комплекс, в состав которого входит 2-кето-3-дезоксиоктановая кислота. Данная антигенная особенность позволяет определять хламидийный антиген группоспецифической сывороткой.

## Лабораторная диагностика

Диагноз урогенитального хламидиоза основывается на данных анамнеза, клинической картине и подтверждается результатами лабораторных исследований. Результаты лабораторных исследований в процессе лечения позволяют оценить адекватность проводимой терапии, а по окончанию ее оценить полноту излечения.

Диагностическая значимость результатов лабораторных исследований зависит от следующих факторов:

1. Выбор соответствующего метода лабораторного исследования;

2. Правильная подготовка пациента к исследованию;

3. Правильное взятие врачом-клиницистом биоматериала для исследования из соответствующих очагов поражения;

4. Правильная предварительная подготовка биоматериала и своевременное проведение исследования;

5. Материально-техническое обеспечение лабораторного исследования;

6. Уровень квалификации медицинского персонала, проводящего исследование.

Для диагностики хламидийной инфекции используют 4-е группы методов:

1. Культуральный метод;

2. Цитологический метод;

3. Методы, в основе которых лежат иммунологические реакции;

4. Методы, использующие принципы молекулярной биологии.

### 3.2.1 Культуральный метод

Культивирование С. trahomatis на перевиваемых линиях клеток млекопитающих, либо в клетках желточных мешочков куриных эмбрионов с последующей их идентификацией, является самым специфичным и наиболее чувствительным методом лабораторной диагностики хламидиоза. Культуральный метод считается “золотым стандартом”, с которым сравнивают специфичность и чувствительность всех других методов лабораторной диагностики. Для диагностики хламидиоза культуральным методом нужна специальная лаборатория, оборудованная всем необходимым для работы с культурами тканей и перевиваемыми линиями клеток, специально подготовленный высококвалифицированный медперсонал. Метод трудоемкий, требует значительного времени для получения окончательного ответа (от 3 до 14 дней и более при проведении нескольких пассажей). Поэтому до настоящего времени культуральный метод диагностики урогенитального хламидиоза не получил широкого распространения в практической лабораторной диагностике и используется в основном для научных целей, а также для сравнительной оценки специфичности и чувствительности других методов диагностики хламидиоза.

### Цитологический метод

Цитологический метод лабораторной диагностики наиболее простой и доступный. Данный метод дает общее представление о цитологической картине, морфологии клеток из очага поражения, наличии микробного обсеменения, мицелия грибковой флоры и простейших. Специфические морфологические признаки позволяют определить наличие хламидий в препарате.

Препарат фиксируют метиловым спиртом (5 мин), либо 96% этиловым спиртом (5 мин), либо смесью Никифорова (1 часть этилового спирта и 2 части этилового спирта - 5 мин), либо охлажденным безводным ацетоном (3 - 5 мин).

После фиксации высушенные мазки окрашивают по Романовскому-Гимзе или по Маккиавело.

Окраска по Романовскому-Гимзе: краску Романовского-Гимзе разводят в соотношении 1:10 фосфатным буфером с рН 7.2 - 7.6 (1 часть краски и 9 частей фосфатного буфера) и наносят на мазок на 1 - 2 часа, далее препарат промывают под проточной водой, прополаскивают дистиллированной водой, дифференцируют, погружая на 1 - 3 секунды в 96% этиловый спирт, высушивают и микроскопируют с использованием иммерсионной системы при общем увеличении микроскопа в 900 - 1500 раз (ок. 10-15, об. 90-100).

При микроскопии ЭТ хламидий представляют собой мелкие (0.15 - 0.3 мкм) образования округлой формы, окрашенные в розовый или красноватый цвет. Они могут находиться как внеклеточно (преимущественно), так и внутриклеточно. Более крупные РТ (0.5 - 1.5 мкм) окрашиваются в различные оттенки от голубого до темно-синего цвета и находятся внутриклеточно, при микроскопическом исследовании они обнаруживаются в виде скоплений вокруг ядра эпителиальной клетки в форме “шапочки жандарма” или диффузно.

Ядра клеток при данной окраски имеют вишневый оттенок различной интенсивности, а цитоплазма прокрашивается в нежно-голубой цвет.

Окраска по Маккиавелло: мазок-отпечаток на предметном стекле фиксируют над пламенем горелки несколько секунд и далее окрашивают 0.25% раствором основного фуксина в течение 5 минут. Затем краску смывают под проточной водой. Препарат помещают на несколько секунд в 0.5% раствор лимонной кислоты и затем промывают под проточной водой. Последний этап - дополнительное окрашивание 1% раствором метиленового синего в течение 20 - 30 сек, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с использованием иммерсионной системы при общем увеличении микроскопа в 900 - 1500 раз.

Ядра клеток окрашиваются в бледно-розовый цвет, цитоплазма - в нежно-голубой. РТ (внутриклеточные) окрашиваются в различные оттенки голубого цвета (от светлого до темного), ЭТ имеют красноватый цвет и могут находиться как внутриклеточно, так и внеклеточно (преимущественно).

Цитологические методы просты в выполнении, дешевые, не требуют сложного оборудования, больших временных затрат, специальной подготовки и дополнительных навыков у лаборантов и врачей-лаборантов, владеющих техникой световой микроскопии. Однако их диагностическая значимость очень низкая: у больных мужчин диагностировать хламидийную инфекцию цитологическим методом в соскобах из уретры удается лишь в 10 - 15% случаев, а у женщин - до 30 - 40% случаев (в соскобах из цервикального канала).

В тоже время цитологический метод позволяет выявить неспецифические морфологические изменения эпителиальных клеток, которые могут косвенно свидетельствовать о наличии поражения урогенитального тракта, в том числе и хламидийной этиологии. Нормальные эпителиальные клетки имеют круглое ядро диаметром 10 - 15 мкм, цитоплазма при окраске по Романовскому-Гимзе прокрашивается в голубой цвет, хроматин - в пурпурный. Сама клетка - округлой формы, диаметр ее достигает 20 - 25 мкм. В соскобах у больных с хламидийной урогенитальной инфекцией могут быть следующие морфологические изменения эпителиальных клеток: клетки увеличены в размере, диаметром до 30 мкм и более, цитоплазма их нередко вакуолизирована, может иметь включения различного размера - от 0.3 до 0.5 мкм и более. Иногда можно наблюдать клетки с явлениями фагоцитоза. В клетках происходит изменение морфологии ядра: отмечается полиморфизм, макронуклеоз - увеличение ядра до 15 мкм и более, полинуклеоз (2 и более ядер в клетке). В соскобах также могут встречаться лимфоциты, полиморфноядерные лейкоциты, плазмоциты и мононуклеарные клетки. Выраженность морфологических изменений часто коррелирует с выраженностью патологического процесса.

Описанные клеточные изменения могут служить косвенным признаком хламидийной инфекции. Цитологический метод пригоден для проведения массовых и первичных обследований урологических и гинекологических больных с последующим обследованием их более специфическими и диагностически значимыми методами при получении патологических или сомнительных результатов.

### Методы, в основе которых лежат иммунологические реакции

Данная группа методов основана на комплементарном взаимодействии специфического антигена (АГ) с антителом (АТ) с последующим проявлением продукта флюорохромом или посредством цветной биохимической реакции.

При диагностике урогенитального хламидиоза можно определять в биологическом материале либо наличие родоспецифического (группового) антигена (в моче, отделяемом половых органов, в материале из соскоба), либо специфические антихламидийные антитела - иммуноглобулины различных классов: А, М, G - в сыворотке крови. Для этого используют два основных метода: иммуноферментный анализ (ИФА) и реакцию иммунофлюоресценции (РИФ).

#### ИФА

ИФА известен давно и широко применяется для диагностики в инфекционной патологии. В настоящее время на рынке диагностических тест-систем предлагается большое количество наборов как зарубежных, так и отечественных фирм-производителей. Методом ИФА определяют наличие и титр (либо количество) противохламидийных антител - иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови обследуемого. Хламидии обладают слабой антигенной активностью, вследствие чего выработка и накопление антител в организме происходит в малых количествах. Кровь для исследования следует брать в период ярких клинических проявлений преимущественно системного характера. Сыворотку, полученную после центрифугирования, при необходимости можно хранить при +4 - +8°С до 5 дней, либо при -20°С 1 месяц. Рекомендуется исследовать парные сыворотки для выявления динамики титра антител в процессе течения заболевания и проводимого лечения. Наборы ИФА-метода содержат в своем составе положительный и отрицательный контроли, по соотношению с которыми судят о наличии или отсутствии специфических антител и их количестве в сыворотке крови обследуемого. Методика постановки ИФА приводится в инструкции к каждому конкретному набору и включает этапы:

1. Инкубация соответствующего разведения сыворотки крови обследуемого на планшете (или с шариком в пробирке) сенсибилизированным родоспецифическим хламидийным антигеном для взаимодействия с ним специфических противохламидийных антител (иммуноглобулинов) - образование комплекса антиген-антитело (АГ - АТ);

2. Отмывание планшета (шарика) от непровзаимодействовавших иммуноглобулинов;

3. Инкубация образовавшегося комплекса АГ-АТ с антисывороткой к иммуноглобулинам человека (общим или какого-либо определенного класса, в зависимости от того - определяется ли просто факт наличия АТ к хламидиям или наличие АТ, относящихся к определенному классу иммуноглобулинов А, М, G), меченой ферментом;

4. Отмывание планшета (шарика) от непровзаимодействовавших меченых антител;

5. Проведение ферментативной биохимической реакции в результате которой образуется цветной продукт. Интенсивность окраски раствора соответствует количеству фермента в реакционной смеси, следовательно количеству образовавшихся комплексов АГ-АТ, число которых определяется содержанием противохламидийных антител в сыворотке крови обследуемого. Количество окрашенного продукта промеряют на ридере (специальный фотоколориметр).

В последнее время появились ИФА тест-системы, в которых на 3 этапе используют антитела, меченые флюорохромами. В этом случае 5 этап не проводят, количество антихламидийных антител определяют измерением свечения образовавшихся сложных комплексов АГ-АТ-меченое АТ на ридере флюориметре.

Некоторые фирмы предлагают ИФА тест-системы для обнаружения хламидийного антигена в отделяемом, соскобах из урогенитального тракта и других локусов (конъюнктива, слизистая прямой кишки и пр.). Биоматериал берут специальными зондами и помещают в транспортную среду для хранения и предварительной обработки. Дальнейшее проведение анализа имеет те же этапы, как при исследовании сыворотки крови. Обнаружить хламидийный антиген ИФА методом удается у 50-70% больных.

ИФА методы диагностики хламидийной инфекции получают все более широкое распространение в последнее время. Но необходимо отметить, что наличие противохламидийных антител в сыворотке крови свидетельствует о контакте организма с хламидиями. Обнаружить антихламидийные АТ удается лишь у 55 - 65% больных, количество ложноположительных результатов может составлять 2 - 5%. Уровень антител зависит как от иммунореактивности организма, так и от скорости их элиминации из организма. Поэтому постановка диагноза хламидиоза по единичному анализу возможна лишь при наличии высокого титра противохламидийных антител преимущественно IgМ класса. Наиболее корректно использовать определение уровня противохламидийных АТ для оценки динамики течения заболевания и корректности проводимой терапии. Для этого проводят исследование парных сывороток крови. Четырехкратное и более увеличение титра АТ свидетельствует об обострении или прогрессировании заболевания. Снижение титра антител в процессе лечения свидетельствует об адекватности и эффективности проводимых лечебных мероприятий. Противохламидийные АТ могут сохраняться в организме после излечения до года и более.

ИФА методы сравнительно просты в выполнении, не требуют значительных временных затрат (время реакции от момента взятия материала до получения ответа составляет 1.5 - 3.5 часа). Однако для их выполнения необходим комплект оборудования для проведения ИФА (инкубатор, шейкер, вошер, ридер и набор автоматических микродозаторов), соответствующее помещение и подготовка медицинского персонала. Диагностическая значимость (специфичность и чувствительность) ИФА при урогенитальном хламидиозе составляет 50 - 70% по сравнению с культуральным методом.

#### РИФ

Реакция иммунофлюоресценции основана на взаимодействии противохламидийного АТ с родоспецифическим хламидийным антигеном. Существует два типа реакции иммунофлюоресценции - прямой и непрямой. В первом случае непосредственно специфическое антитело мечено флюорохромом и реакция проходит в один этап, что значительно сокращает сроки исследования. Во втором случае специфическое антитело не имеет метки, а для выявления комплекса АГ-АТ, образовавшегося на первом этапе, используют вторые меченые антитела, специфичные к антихламидийным антителам. Результат реакции оценивают визуально при помощи люминисцентного микроскопа.

Помимо импортных появились отечественные наборы для диагностики хламидийной инфекции реакцией прямой иммунофлюоресценции, которые практически не уступают по специфичности и чувствительности, но имеют значительно более низкую цену.

Материалом для исследования служат мазки-отпечатки, приготовленные с соблюдением правил. Мазки для РИФ готовятся на специальных деколированных стеклах в пределах ограниченной площадки диаметром 8 - 10 мм. После этого их высушивают на воздухе и фиксируют, погружая на 5 - 10 минут в холодный 96% (лучше абсолютный) этиловый спирт или нанося на препарат 0.1 - 0.15 мл охлажденного безводного ацетона до полного его испарения. Фиксированные препараты можно исследовать сразу или при необходимости хранить при комнатной температуре в течение суток или при -20°С в течение 2 недель (при этом необходимо исключить доступ влаги при хранении и доведении препарата до комнатной температуры перед исследованием при помощи полиэтиленового пакета и селикагеля).

При проведении прямой РИФ на препарат наносят раствор меченых антител в количестве, необходимом для полного покрытия мазка (25 - 30 мкл). Препарат инкубируют в горизонтальном положении во влажной камере в течение 15 минут при +37°С. Подсыхание реагента недопустимо во избежание ложноположительных результатов. Далее мазок промывают в проточной воде 30 сек, прополаскивают в дистиллированной воде, высушивают и готовят к микроскопии.

При проведении непрямой РИФ на препарат наносят необходимое количество раствора антихламидийных антител и проводят первую инкубацию в тех же условиях, что и при проведении прямой РИФ. Затем препарат промывают, высушивают на воздухе и наносят второй реагент - меченые антитела к хламидийным АТ и проводят вторую инкубацию так же во влажной камере при +37°С 15 минут. После промывания препарат высушивают и готовят к микроскопии. Готовые препараты рекомендуется просматривать сразу. При необходимости возможно хранение окрашенных препаратов в течение 1 - 2 суток при +2-8°С в темном месте без доступа влаги.

Микроскопию проводят с использованием иммерсионной системы. Возможны два варианта иммерсионной микроскопии:

1. Масляная иммерсия: На готовые высушенный препарат наносят 20 - 25 мкл монтирующей жидкости (глицерин, забуференный фосфатным буфером с рН 7.2 - 7.6), покрывают его обезжиренным покровным стеклом, на которое затем наносят каплю нефлюоресцерующего иммерсионного масла и микроскопируют объективом (маркировка “Л” - люминисцентный) с увеличением 90 и окуляром с увеличением 5.

2. Водная иммерсия: на готовый препарат наносят каплю 20 мкл фосфатного буфера с рН 7.4 и микроскопируют объективом для водной иммерсии (маркировка - белая полоса и “Л” - люминисцентный) с увеличением 60 и окуляром с увеличением 5. Водная иммерсия дает более ровное, яркое и четкое свечение.

РИФ позволяет выявлять антигенные структуры как элементарных, так и ретикулярных телец. ЭТ расположены преимущественно внеклеточно, округлой формы с ровными краями, мелкие (размер 1:100 - 1:150 по отношению к окружающим их клеткам), однородной структуры, имеют яркое специфическое изумрудно-зеленое свечение, которое при работе микровинтом может давать дифракционные кольца (кольца Дилекторского). РТ встречаются значительно реже, располагаются преимущественно внутриклеточно, имеют менее однородную структуру, более полиморфны, но также с четкими краями и обладают ярким специфическим изумрудно-зеленым свечением. Любой другой флюоресцирующий материал неправильной формы, неровными нечеткими краями, имеющий неяркую зеленую окраску, либо свечение другого цвета относится к артефактам. Интенсивность, яркость и оттенок специфического свечения зависит от рН монтирующей жидкости или буфера используемого для микроскопии. Большая интенсивность свечения ФИТЦ в щелочной среде увеличивает чувствительность метода, но ведет к увеличению числа объектов с неспецифическим свечением, а, следовательно, к ложноположительным результатам. В кислой среде интенсивность свечения ФИТЦ падает, что может дать ложноотрицательный результат. Сопутствующая микрофлора, а также ядра окружающих клеток неспецифически окрашиваются в различные оттенки оранжевого цвета бромистым индием, их цитоплазма - в различные оттенки кирпично-коричневого цвета синькой Эванса.

Для получения достоверного результата рекомендуется просматривать многие поля зрения препарата. Результат считается положительным в том случае, если препарат содержит клетки эпителия и удается обнаружить не менее 6 элементарных телец, имеющих все вышеперечисленные признаки.

Обнаружение меньшего количества возбудителя делает результат сомнительным и требует повторного исследования, желательно на фоне провокации (пищевая - алкоголь, медикаментозная - инъекция пирогенала, механическая - массаж уретры на буже). Контроль излеченности следует проводить не ранее чем через две недели, так как возможно сохранение не элиминированного антигенного материала нежизнеспособного возбудителя, что будет давать ложноположительные результаты. Получение 3 отрицательных результатов исследования у мужчин в течение месяца и у женщин в течение 3 менструальных циклов, отсутствие клинических проявлений хламидийной инфекции свидетельствует о выздоровлении.

РИФ при правильной подготовке пациента, соблюдении правил взятия материала и постановки реакции является высокочувствительным и специфичным методом диагностики урогенитального хламидиоза и позволяет выявлять возбудителя у 90 - 95% больных. Данный метод относительно дешев, прост в выполнении, высокоинформативен, не требует специального дорогостоящего оборудования, позволяет быстро получить результат (0.5 - 1 час) и визуально контролировать качество взятия материала для исследования.

### Методы, использующие принципы молекулярной биологии

В группу входят методы ДНК-зондов и полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые позволяют выявить генетический материал возбудителя в исследуемом биоматериале. Наборы для диагностики хламидиоза ДНК-зондами находятся пока на стадии разработки и клинических испытаний.

ПЦР активно внедряется в практику лабораторной диагностики. Метод основан на выделении специфической последовательности ДНК или РНК возбудителя при помощи комплементарных праймеров, последующего ее многократного копирования и накопления для дальнейшего выявления обычными методами детекции (электрофорез или ИФА). Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, практически приближающейся к культуральному и позволяет обнаружить единичных возбудителей в исследуемом материале. Метод ПЦР требует специального дорогостоящего оборудования, отдельной специально оснащенной лаборатории, соответствующей подготовки и высокой квалификации медицинского персонала. Вместе с тем, отсутствие сертификации используемых в России праймеров и достаточного опыта применения метода ПЦР, специфичность исследуемого материала, частая его контаминация сопутствующей микрофлорой (что может давать ложноположительные результаты) не позволяет однозначно судить о его ценности при диагностике урогенитального хламидиоза.

Таким образом, в настоящее время наиболее доступным, простым и в то же время высокоинформативным методом диагностики урогенитального хламидиоза и установления излеченности является реакция прямой иммунофлюоресценции (РИФ). Контроль за динамикой течения заболевания и эффективностью лечения следует проводить, определяя титр антихламидийных антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА).

# **4 Урогенитальный трихомониаз**

Урогенитальный трихомониаз – широко распространенное инфекционное воспалительное заболевание, передаваемое преимущественно половым путем, вызывается простейшими Trichomonas vaginalis.

Трихомонады являются жгутиковыми эукариотами и относятся к простейшим из класса Flagellata, семейства Trichomonadida, рода Trichomonas. В человеческом организме паразитируют 3 вида трихомонад: Trichomonas intestinalis - кишечная трихомонада, Trichomonas elongata (tenax, buccalis) - ротовая трихомонада и Trichomonas vaginalis - влагалищная трихомонада. Только Tr. vaginalis поражает урогенитальный тракт и является патогенной для человека, вызывая воспалительные заболевания: уретрит, простатит, эндоцервицит, вагинит, бартолинит и т.д.

## Биологические свойства Tr. vaginalis

Влагалищные трихомонады являются одноклеточными простейшими. Форма их вариабельна, чаще грушевидная - в нативных препаратах (висячая капля), но наряду с этим могут наблюдаться овальные, шарообразные, несколько удлиненные - веретенообразной формы. Длина тела влагалищной трихомонады колеблется от 5 до 30 мкм, ширина – 5 - 8 мкм. Она покрыта оболочкой - пелликулой. Тело влагалищной трихомонады состоит из цитоплазмы, ядра, парабазального тела, блефаропласта, ризопласта, аксостиля, ундулирующей мембраны, краевой и парабазальной фибриллы и жгутиков. Цитоплазма состоит из тонкозернистой массы. Ядро продолговато-овальной формы, расположено в передней трети тела. Впереди ядра, на переднем конце тела трихомонады, находится блефоропласт, от которого берут начало направляющиеся вперед 4 свободных жгутика. Они выполняют роль органоидов движения и принимают участие в захватывании пищи. Обнаружение жгутиков при просмотре нативных препаратов служит дифференциально-диагностическим признаком влагалищных трихомонад от других элементов материала (лейкоциты, эпителиальные клетки). Степень подвижности жгутиков отражает биологическую активность возбудителя. В окрашенных препаратах жгутики трудно различимы, что обусловлено их хрупкостью и повреждением при фиксации и окраске препарата.

Влагалищные трихомонады размножаются делением, как простым продольным делением на две части, так и множественным. Полный цикл деления занимает от 0.5 до 1.5 - 3 часов. Перед делением движение трихомонады замедляется, разделяется блефаробласт и жгутики, число которых удваивается. Далее делится ядро, дочерние ядра расходятся к противоположным полюсам. После перешнуровки цитоплазмы образуются две новые особи.

Трихомонады являются факультативными анаэробами. Оптимум роста наблюдается при +37°С. Они легко культивируются в питательных средах в присутствии или отсутствии других микроорганизмов.

Встречаются штаммы влагалищных трихомонад, которые авирулентны для их носителей и не вызывают у них видимых клинических реакций со стороны слизистых мочеполовых органов. Однако, при передаче их в процессе полового акта партнеру с переменой условий обитания они становятся патогенными и вызывают развитие воспалительного процесса в слизистой мочеполовых органов. Возможен переход асимптомной формы трихомониаза в манифестную при нарушении равновесия между макроорганизмом и влагалищной трихомонадой вследствие изменения реактивности организма, происходящим при инфекционных заболеваниях, переохлаждении, переутомлении, изменении гормонального статуса, при действии нервно-психических травм и других стрессорных факторов, приводящих к снижению как местной, так и общей иммуннорезистентности.

Инвазия влагалищной трихомонады способствует переходу постоянных сапрофитов уретры и влагалища у здоровых лиц в вирулентное состояние, что ведет к усилению токсигенного воздействия на ткани органов урогенитального тракта. В результате этого развивается смешанный трихомонадно-бактериальный воспалительный процесс, в котором первичным этиологическим агентом является Tr. vaginalis.

Вагинальные трихомонады способны фагоцитировать бактерии и другие частицы, которые затем перевариваются. Однако возможна персистенция бактерий (гонококков) внутри трихомонады, что способствует их длительному существованию в организме в скрытом, недоступном для антибактериальной терапии состоянии.

Влагалищные трихомонады могут сохранять жизнеспособность в неразведенных выделениях или в культурах, разведенных физиологическим раствором, или в других солевых растворах в течение нескольких часов, однако они плохо переносят гипотонические растворы, а высушивание и температура свыше 45°С убивает их мгновенно.

## 4.2 Лабораторная диагностика

Для обнаружения Tr. vaginalis используют следующие основные методы:

1. Микроскопия нативных препаратов;

2. Микроскопия окрашенных препаратов;

3. Культуральный метод;

4. Иммунологический метод.

### 4.2.1 Микроскопия нативных препаратов

При микроскопии нативных препаратов, возбудителя обнаруживают по его специфическому движению среди клеточных элементов и микроорганизмов в препарате, приготовленном непосредственно перед исследованием. Просмотр влагалищной трихомонады в нативных препаратах проводят методом раздавленной капли - “капли-суспензии” и реже методом “висячей” капли.

При приготовлении препарата “капли-суспензии” на сухое, обезжиренное и предварительно прогретое до 37°С предметное стекло наносят каплю теплого физиологического раствора хлорида натрия и смешивают в нем исследуемое отделяемое из очага заболевания (теплый физиологический раствор активирует влагалищную трихомонаду и увеличивает ее подвижность). Взвесь накрывают покровным стеклом, избегая образования воздушных пузырьков в препарате. Избыток жидкости, вышедшей за границы покровного стекла удаляют фильтровальной бумагой. Смывы со слизистой уретры, влагалища и негустые осадки центрифугатов, полученных на физиологическом растворе, а также культуры трихомонад, выделенные на жидких средах исследуются в нативных препаратах без дополнительного разведения.

При приготовлении препарата “висячая капля” на середину покровного стекла, края которого предварительно смазываются вазелином, наносится теплый (37 - 38°С) физиологический раствор, к которому добавляется исследуемый материал, осторожно перемешивается. Покровное стекло переворачивают и накладывают каплей вниз над лункой специального предметного стекла для просмотра “висячей капли”. Капля должна свободно свисать в углублении предметного стекла, не соприкасаясь с его краями и дном.

Ввиду того, что при длительном пребывании препаратов при комнатной температуре трихомонады теряют подвижность, исследование следует проводить возможно быстрее после получения материала (в течение не более 1 часа).

Исследование нативных препаратов проводят под микроскопом с естественным или искусственным освещением немедленно после его приготовления при общем увеличении 280 - 400 раз (объектив 40, окуляр 7 или 10). Влагалищная трихомонада определяется по грушевидной, округлой или овальной форме тела по размерам близким к лейкоцитам. Она имеет характерные толчкообразные движения ундулирующей мембраны и жгутиков, которые особенно хорошо видны при исследовании в микроскопе с темнопольным или фазовоконтрастным конденсором. Трихомонады совершают активные движения поступательного и вращательного характера.

При исследовании нативных препаратов влагалищные трихомонады трудно отличимы от жгутиковых семейства бодонидов, которые могут быть занесены в препарат из воды, загрязненной посуды и т.д. В отличие от трихомонад, бодониды имеют 2 жгутика и быстро двигаются по прямой. К ошибкам может привести наличие в препарате подвижных бактерий, которые, прикрепляясь к лейкоцитам, создают впечатление большого количества подвижных трихомонад.

Метод нативных препаратов высоко специфичен. Однако обнаружить в них влагалищные трихомонады можно лишь при наличии жизнеспособного возбудителя с активной подвижностью, что достигается технически правильным взятием материала и своевременным его просмотром. Чувствительность метода снижена при бессимптомном течении заболевания. Измененные формы трихомонад, неподвижные особи редко выявляются данным методом.

### Микроскопия окрашенных препаратов

Для выявления влагалищных трихомонад мазки с материалом после фиксации возможно окрашивать различными способами, как простыми - окрашивание одним красителем, так и сложными - окрашивание несколькими красителями. После окрашивания мазки микроскопируют с использованием иммерсионной системы микроскопа и общим увеличением 500 - 1000 раз. Материал берут из очагов поражения при помощи стерильного зонда и наносят на чистое обезжиренное предметное стекло равномерным тонким слоем. После высушивания на воздухе, препараты фиксируют в течение 3 - 5 минут в метиловом спирте, или этиловом 96% спирте, или в смеси Никифорова. Наиболее часто используют следующие способы окраски:

1. Окрашивание по Романовскому-Гимзе. Фиксированный препарат помещают в рабочий раствор краски (исходный раствор краски разведенный дистиллированной водой в соотношении 1:10) на 25 - 60 минут, затем его промывают водой, высушивают и микроскопируют с использованием иммерсионной системы. Ядра трихомонад окрашиваются в фиолетовый или фиолетово-рубиновый цвет, протоплазма - в голубой, блефаропласт, жгутики, аксостиль и хроматиновые зерна протоплазмы окрашиваются в розовый или красный цвет;

2. Окрашивание 1% водным раствором метиленового синего (1 г метиленового синего растворяют в 100 мл дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр). На препарат наносят 1% раствор метиленового синего на 1 минуту, затем тщательно смывают оставшийся краситель под струей холодной воды, высушивают и микроскопируют. Препарат синего цвета. Бактериальная флора прокрашивается в синий цвет разной интенсивности. Влагалищные трихомонады различной формы расположены в слизи, между клеточными элементами - четко просматривается оболочка, ядро расположено эксцентрично, интенсивно окрашено в синий цвет, протоплазма нежная, сетчатая, светло-синяя, вакуоли бесцветны.

3. Окрашивание 0.5% раствором бриллиантового зеленого (0.5 г бриллиантового зеленого растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды, фильтруют в горячем виде через бумажный фильтр). На препарат наносят 0.5% водный раствор бриллиантового зеленого на 1 минуту, затем тщательно смывают краситель под струей холодной водопроводной воды, высушивают и микроскопируют. Препарат зеленого цвета - ядра клеток окрашены в зеленый цвет, протоплазма - в светло-синий. Слизь зеленого цвета. Бактериальная флора окрашивается в зеленый цвет разной интенсивности. Влагалищные трихомонады различают разной формы, они расположены между клеточными элементами в слизи, четко просматривается оболочка, ядро интенсивно окрашено в зеленый цвет, расположено эксцентрично, протоплазма сетчатая, светло-зеленого цвета, вакуоли бесцветны.

4. Окрашивание по модифицированному способу Грама. Метод основан на свойстве влагалищных трихомонад и других грамотрицательных микроорганизмов при обесцвечивании их определенное время в этиловом спирте, отдавать основной фиолетовый краситель и докрашиваться, в дальнейшем, дополнительным оранжево-красным.

Реактивы:

- 1% водный раствор кристаллвиолета (1 г кристаллвиолета растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды, раствор фильтруют в горячем виде через бумажный фильтр);

- водный люголевский раствор (2 г йодистого калия растворяют в 300 мл дистиллированной воды, в полученном растворе растворяют 1 г чистого йода, фильтруют через бумажный фильтр;

- 96% этиловый спирт;

- 1% водный раствор нейтрального красного (1 г нейтрального красного растворяют в 100 мл дистиллированной воды и фильтруют через бумажный фильтр.

Препарат покрывают полоской фильтровальной бумаги и заливают ее 1% раствором кристаллвиолета на 1 минуту. Следят, чтобы между фильтровальной бумагой и стеклом не было пузырьков воздуха, их удаляют, придавливая полоску смоченной кристаллвиолетом фильтровальной бумаги стеклянной палочкой. Через 1 минуту бумагу снимают, препарат промывают водопроводной водой и заливают раствором Люголя, который выдерживают в течение нескольких секунд до почернения мазка. Затем остаток люголевского раствора смывают и приступают к обесцвечиванию препарата в 96% этиловом спирте. Обесцвечивание проводят под контролем глаза, поочередно погружая и вынимая препарат из спирта, находящегося в стаканчике. Обесцвечивают препарат до тех пор, пока с его тонких участков перестанут стекать фиолетовые струйки красителя и они станут бледно-серого цвета. Препарат быстро промывают под струей водопроводной воды, а затем докрашивают в течение 3 минут 1% водным раствором нейтрального красного. Препарат тщательно промывают, пока струя воды, стекающая с него, не станет прозрачной, высушивают и микроскопируют. При правильной окраске препарат оранжево-красного цвета на тонких участках, лилово-фиолетового на толстых. Ядра клеточных элементов (лейкоцитов, эпителиальных клеток) частично удерживают основную фиолетовую окраску, т.е. в центре они должны быть окрашены в фиолетовый цвет, по периферии в оранжево-красный. Высокое качество окраски обеспечивается своевременным прекращением обесцвечивания препарата.

Влагалищные трихомонады окрашиваются бледно - оболочка в виде тонкой полоски окружает сетчатую протоплазму оранжево-красного цвета, ядро сиреневого или фиолетового цвета, жгутики и ундулирующая мембрана не просматривается. Положительный ответ нужно давать при обнаружении только типичных форм влагалищных трихомонад. При обнаружении измененных (округлые, нетипично-окрашенные и др.), но похожих на влагалищных трихомонад простейших, надо исследовать повторно взятый материал или сделать посев на питательные среды.

Микроскопия окрашенных препаратов является простым, дешевым и доступным методом, не требующим немедленного проведения исследования и специального оборудования. Однако он имеет низкую чувствительность и специфичность.

### Культуральный метод

Культуральный метод наиболее чувствительный и специфичный. Влагалищные трихомонады дают хороший рост на искусственных питательных средах при условии соблюдения правил забора материала для исследования и его культивирования. Питательные среды должны содержать антибиотики для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Влагалищные трихомонады - факультативные анаэробы. Оптимум их роста в слабокислой среде при среднем рН 5.8 - 6.3 и +37°С, поэтому перед посевом культуральную среду следует прогреть, если она хранилась в холодильнике. Следует избегать перегрева культуры выше 37-38°С, т.к. повышение температуры влагалищные трихомонады переносят хуже, чем понижение. Материал для исследования из очагов поражения следует брать стерильным зондом или бактериальной петлей. Материалом для исследования могут служить центрифугаты смывов стерильным физиологическим раствором, которые вносят в культуральную среду стерильной пастеровской пипеткой. Стерильной пастеровской пипеткой следует пользоваться при пересеве выделенных штаммов.

При выращивании на жидких питательных средах влагалищные трихомонады дают придонный рост в виде плотного беловатого осадка, из которого пастеровской пипеткой берут материал для исследования в нативном препарате. Микроскопическое исследование культур и идентификацию следует производить на 3 - 5-й день, при отрицательных результатах на 7 - 9-й и на 11 - 17-й день после посева, т.к. длительность цикла развития влагалищных трихомонад в культуре зависит от величины посевной зоны. Из придонного роста готовят нативный препарат одним из описанных выше способов и микроскопируют с объективом 40 или 90, окуляр 7 или 10. Влагалищные трихомонады в поле зрения могут быть одиночными или большими скоплениями, активно движущиеся, при этом хорошо просматривается движение жгутиков и ундулирующей мембраны. Возможно определять влагалищные трихомонады в культуре методом РНИФ (реакция непрямой иммунофлюоресценции).

Культуральный метод длительный по времени, требует дорогостоящих сред.

### Иммунологический метод

Иммунологический метод позволяет определить специфический поверхностный антиген влагалищной трихомонады реакцией непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) посредством набора “ТрихоСлайд”. Материалом для исследования служат мазки-отпечатки из очагов поражения, которые наносят на чистое обезжиренное предметное деколированное (со специальной лункой) стекло стерильными одноразовыми зондами, имеющими ватный тампон с повышенными сорбционными свойствами. При нанесении материала тампоном многократно касаются поверхности предметного стекла. После высыхания на воздухе препарат фиксируют 5 минут 96% этиловым спиртом или ацетоном (наносят на препарат несколько капель безводного ацетона до полного его испарения). Фиксированные препараты лучше не хранить, т.к. при хранении влагалищные трихомонады разрушаются, что может затруднить постановку правильного диагноза. После фиксации проводят “окрашивание” препарата, которое имеет два этапа. На первом этапе на препарат наносят 30 мкл реагента №1- специфические противотрихомонадные АТ - и инкубируют его во влажной камере (избегать подсыхания реактива) при комнатной температуре или 37°С 15 минут. Затем препарат промывают дистиллированной водой 30 секунд, высушивают на воздухе и наносят 30 мкл реактива №2 - антитела к противотрихомонадным АТ, меченые ФИТЦ - инкубируют 15 минут во влажной камере при комнатной температуре или 37°С. После этого препарат промывают 30 секунд дистиллированной водой, высушивают на воздухе и микроскопируют в люминисцентном микроскопе с использованием масляной или водной иммерсионной системы. Препараты к микроскопии готовят также, как и при диагностике хламидиоза методом РИФ.

Трихомонады выявляются в виде полиморфных мембраноограниченных структур, имеющих ярко-зеленое свечение. У подвижных форм могут прокрашиваться жгутики. Неспецифическая бактериальная флора окрашивается в оранжевый цвет, клетки эпителия, лейкоциты, сперматозоиды окрашиваются в оранжевый и красно-бурый цвета. Допускается неспецифическое диффузное слабо-зеленое свечение цитоплазмы эпителиальных клеток, слизи и посторонней микрофлоры. Результат считают отрицательным, если в мазке отсутствует специфическое свечение при обязательном наличии не менее 10 клеточных элементов.

Метод РНИФ обладает высокой чувствительностью и специфичностью, сравнимой с культуральным методом, позволяет выявлять нежизнеспособные формы возбудителя, не определяемые культуральным методом. В отличие от нативных препаратов, он позволяет выявить атипичные и неподвижные формы влагалищных трихомонад. Это повышает его диагностическую значимость. Метод РНИФ сравнительно дешев, прост в выполнении, не требует специального оборудования, позволяет визуально контролировать качество взятия материала и получить ответ в течение 40 - 60 минут. Все это делает его методом выбора для диагностики урогенитального трихомониаза.

**Вывод**

Окончательное установление диагноза заболевания возможно при обнаружении возбудителя или наличия антител в отделяемом из очагов поражения или в крови пациента методами микроскопического, бактериологического, а также иммунологического (серологического) исследований.

В целях совершенствования контроля за ЗППП рекомендовано создать в качестве структурных подразделений центральные лаборатории, сосредоточив в них все виды исследований для микроскопической, вирусологической, бактериологической, серологической иммунологической диагностики инфекций.

Лабораторные исследования в централизованной лаборатории проводятся всеми имеющимися методами:

1. Для диагностики сифилиса: исследование в темном поле микроскопа нативного препарата отделяемого или пунктата лимфатических узлов; серологического исследования крови и ликвора в РСК, реакции Кана, микрореакции прицепитации с кардиолипиновым антигеном, реакции иммобилизации бледных трепонем, реакции иммунофлуоресценции в модификациях, реакции иммунного прилипания, иммуноферментным методом в модификациях, реакции пассивной гемагглютинации.

2. Для диагностики гонореи исследования препаратов, окрашенных метиленовым синим (бриллиантовым зеленым) и по способу Грама, культуральные исследования, определение беталактамазной активности чистых культур гонококка, определение чувствительности гонококков к антибиотикам или другим лекарственным препаратам, постановка реакции Борде‑Жангу.

3. Для диагностики трихомониаза исследование нативных препаратов и окрашенных метиленовым синим и по способу Грама, а также методом выращивания на питательных средах.

4. Для диагностики хламидиоза исследование препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе, ПИФ, с помощью моноклональных антител, ИФА, культуральные исследования.

**Список использованных источников**

1. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. / Г.И. Назаренко [Кишкун А.А.]. – М.: Медицина, 2006. – 544с.
2. Ю.К.Скрипкин, Г.Я.Шарапова, Г.Д.Селисский. Инфекции, передаваемые половым путем. М. – Медицина, 1997 г. – 208 с.
3. М.С. Покровская. Лабораторная диагностика инфекций. ЗАО «Лаборатория генно-инженерных систем «ЛАГИС» . – М. – 1999 г.
4. Башмакова М.А., Бочкарев Е.Г., Говорун В.М., Савичева А.М., Парфенова Т.М. // Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению.- М., 1999.-61 с.
5. Cавичева А.М., Башмакова М.А., Шипицина Е.В., Шалепо К.В., Мартикайнен З.М., Зациорская С.Л., Рыбина Е.В., Новикова Л.Н., Тараскина А.Е. Клиническая оценка генитальных инфекций // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы 3-ой Всероссийской научно-практической конференции.- М.- 2000.- с.79-82 .
6. Е.Г. Бочкарев. Лабораторная диагностика хламидийной инфекции. М. – 2004 г.
7. Р.А. Андреасян, М.В. Яцуха. Оптимизация качества диагностики заболеваний, передаваемых половым путем, функциональные обязанности и нормирование труда персонала лабораторий, занимающихся их диагностикой. // Вестник дерматологии и венерологии. – М. – 2001 г.
8. Приказ № 286 от 7 декабря 1993 г. "О совершенствовании контроля за заболеваниями, передаваемыми половым путём".