

**Кафедра дерматовенерологии с курсом иммунологии**

**СРС**

**на тему:**

**Лабораторная диагностика сифилиса и  
инфекций передаваемых половым путем.**

**Выполнила: Абдраманова Л.С.660**

**гр.**

**Проверила: Винник Т.В.**

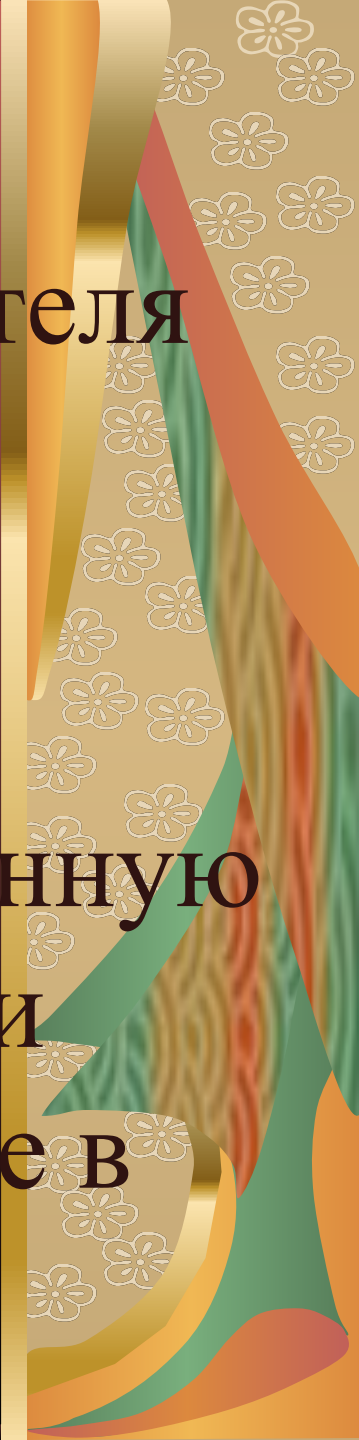
**Астана 2017**



- **Лабораторная диагностика сифилиса**
- Методы обнаружения бледных трепонем традиционно подразделяют на:
  - - прямые (заражение животных, микроскопия в темном поле и т.д.);
  - - не прямые (серологические тесты для выявления АТ).
- Серологические методы:
  - 1) Нетрепонемные тесты, определяющие АТ к липоидным АГ тканей хозяина или возбудителя



- Бактериологический метод.
- 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



- **Серологическая диагностика**

- При серологическом обследовании на сифилис применяется комплекс реакций: стандартные (КСР) – реакция Вассермана с двумя-тремя антигенами и две осадочные реакции (Кана и цитохоловая); 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

- 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



- **1. 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



- **2. 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 отцентрифугировать 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

- **3. 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 реактинов вызывает



## 4. 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 обуславливают 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

- Техника постановки РИФ-200. Из АГ готовят препараты на тонких, обезжиренных предметных стеклах, на обратной стороне которых обозначены кружки диаметром 1 см. АГ 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 NaCl. Для проведения 1 фазы реакции на помещенные во влажную камеру препараты наносят испытуемые сыворотки. После этого влажную камеру закрывают и помещают в



- **5. Реакция иммунофлюоресценции-абсорбции с БТ (FTA-ABS)**

- Используемый для реакции АГ 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 NaCl.

Инактивированную сыворотку инкубируют с сорбентом для абсорбирования неспецифических групповых АТ. 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

- **6. 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 иммобилизиновой испытуемой сыворотки и активного компонента. Реакция ставится в условиях анаэробноз.
- Иммобилизины появляются в сыворотке крови больных

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



- Для контроля набирают в те же смесители все взвеси с активным и инактивированным компонентом, а также одну взвесь без компонента. 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  $+35^{\circ}\text{C}$  на 18-20 ч. Для регистрации опыта через 18 ч смесители вынимают из термостата попарно – опыт и контроль.



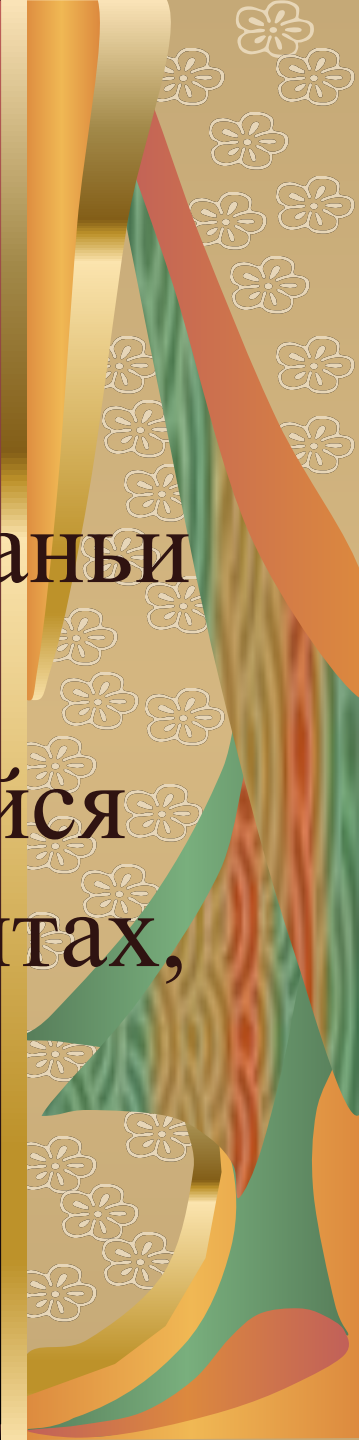
- При определении подвижности трепонем следует учесть, что движения трепонем различны. Они могут обладать весьма активной подвижностью, особенно отчетливы сгибательные движения, а иногда отмечаются только винтовые движения. Иногда трепонема лежит как бы неподвижно, но если присмотреться, то видно, что 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

- **7. Реакция иммунного прилипания бледных трепонем (РИП)**

- Основана на том, что вирулентные тканевые трепонемы, сенсibilизированные 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  $+55-56^{\circ}\text{C}$  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  $+37^{\circ}\text{C}$  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

- 8. Реакция гемагглютинации с бледными трепонемами (ТРПГА)
- Принцип метода заключается в следующем: формализированные тонизированные бараньи эритроциты соединяются с экстрактом из патогенных бледных трепонем. Образующийся комплекс, который фиксируется на эритроцитах, составляет корпускулярный антиген. При соединении АГ с сывороткой, содержащей гомологичные АТ, образуется иммунный



- **9. 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

- **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 кардиолипидными антигенами. В конце 3-й или в течение 4-й недели после появления первичной сифиломы становятся



- 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 положительный результат более чем у половины больных, однако процент иммобилизации трепонем невысок (40 - 60%).
- При вторичном рецидивном сифилисе положительный результат по стандартным





- 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)

- **Иммуноферментный анализ**
- Принцип реакции заключается в соединении сифилитического АГ, сорбированного на поверхности твердофазного носителя, с АТ испытуемой сыворотки крови и выявления специфического комплекса АГ-АТ с помощью антивидовой иммунной сыворотки, меченной ферментом. Взаимодействие фермента с субстратом дает цветную реакцию, интенсивность которой зависит от количества



- **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, мечеными ферментами или радиоактивными веществами.

- IgM-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



- **Полимеразно цепная реакция (ПЦР)**

- Метод заключается в многократном увеличении (амплификации) количества ДНК выявляемого микроорганизма. 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

- **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





- В серологической лаборатории ставятся РВ, реакция Ланге с коллоидным золотом, РИТ, РИФ, РИФ-ц, ТРНА, либо FTAABS, либо IgM ТРНА. Отрицательная ТРНА, либо FTAABS исключает нейросифилис. Положительная IgM ТРНА со спинномозговой жидкостью и индекс ТРНА свыше 10 подтверждают наличие сифилитического процесса в ЦНС. Использование РИФ целесообразно при ликвородиагностике сифилиса. Особенно



# Диагностика урогенитального хламидиоза.

## • Чувствительность и специфичность методов диагностики УГХ

• (по данным литературы)

• Методы

Специфичность, %

• Микроскопический

10-20

• Культуральный

Чувствительность, %

5-30

60-90

100



- *Микроскопический метод* диагностики хламидийной инфекции
- При микроскопии ЭТ хламидий представляют собой мелкие (0.15 - 0.3 мкм) образования округлой формы, окрашенные в розовый или красноватый цвет в очаге воспаления и определении нейтрофильно-гистиоцитарно-макрофагальной реакции. Применяется окраска препаратов по Романовскому – Гимзе, раствором Люголя и др. 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

- **Культуральный метод** основан на выделении живого возбудителя в культуре клеток *in vitro* и характеризуется наиболее высокой стоимостью и трудоемкостью. Для выделения хламидий могут использоваться различные культуры клеток (L-929, McCoу, HeLa-229), обработанные циклогексимидом. При окрашивании по Романовскому – Гимзе ЭТ хламидий имеют розовый цвет, РТ – синий. Метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, поэтому длительное время считался «золотым

- **Метод ПИФ** предусматривает использование в качестве реактива моноклональных АТ к липополисахаридному или белковому АГ хламидий. Результаты оцениваются по характеру специфического свечения хламидий в люминесцентном микроскопе. ПИФ позволяет идентифицировать ЭТ возбудителя, его чувствительность к РТ – ниже.

- Несмотря на высокие показатели



- *Метод ИФА* позволяет определить АТ к хламидиям классов IgA, IgM и IgG в сыворотке крови. При остром течении инфекции диагностически значимо обнаружение антихламидийных АТ классов IgM или IgA, а также установление сероконверсии АТ класса IgG при их нарастании в 2-4 и более раз. Получение положительных результатов ИФА-диагностики возможно через 1-1,5 месяца после эрадикации возбудителя, чувствительность и специфичность метода может варьировать.
- Методика постановки ИФА приводится в инструкции к каждому конкретному набору и включает этапы:
- 1. Инкубация соответствующего разведения сыворотки крови обследуемого на сенсibilизированным родоспецифическим



- 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.
- Обнаружить антихламидийные АТ удастся 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



- *Молекулярно-биологические методы* диагностики УГХ основаны на обнаружении в клинических образцах специфических фрагментов ДНК и/или РНК хламидий. Чувствительность и специфичность этих методов близка к 100%, они не требуют сохранения жизнеспособности возбудителя и могут

- **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.

- 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 нефлюоресцирующего 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

- Для получения достоверного результата рекомендуется просматривать многие поля зрения препарата. Результат считается положительным в том случае, если препарат содержит клетки эпителия и удастся 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

пиробендазол, мехланинол, массаж, уштры на бугре)

- **ПЦР в реальном времени** (или количественная ПЦР) позволяет одновременно осуществить амплификацию и измерение количества молекул ДНК, то есть провести идентификацию и количественное определение возбудителя. Контроль излеченности на основе методов амплификации ДНК (ПЦР, ПЦР в реальном времени) может осуществляться через месяц после окончания антибактериальной терапии.
- **NASBA** (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) – транскрипционный метод амплификации РНК. Он позволяет избирательно выявлять специфическую последовательность РНК в присутствии идентичной последовательности ДНК. Так как мишенью для NASBA служат рибосомальные РНК, количество которых в клетке значительно выше, чем ДНК,

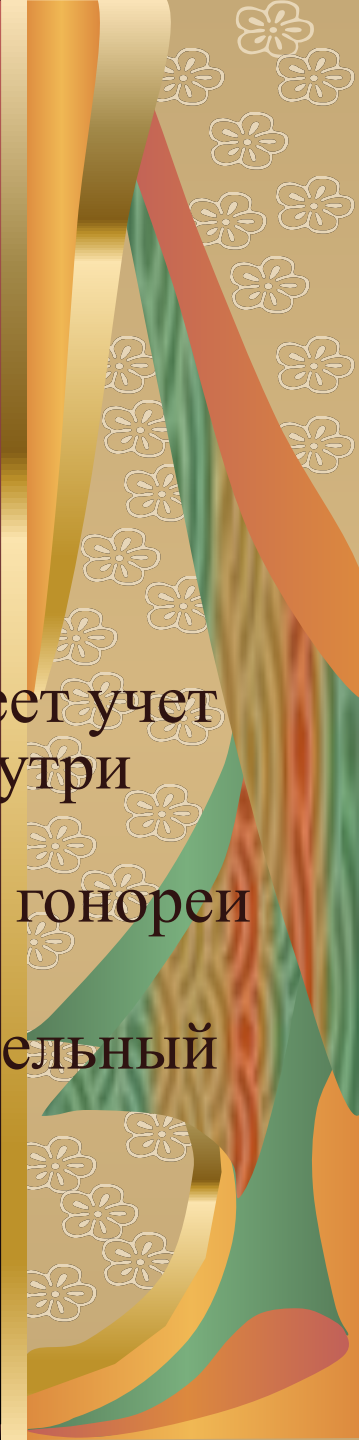


- **Диагностика гонококковой инфекции**
- Этиологическая диагностика проводится с использованием бактериоскопических и бактериологических методов. Если в препарате при бактериоскопии обнаружены типичные гонококки, то культуральное исследование не проводится. Топическая диагностика применяется обязательно для точного определения локализации воспалительного процесса в уретре с помощью двухстаканной пробы. Более точная топическая диагностика осуществляется методом

- **Микроскопические методы исследования**
- 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.

• Диагноз уретрита у мужчин устанавливается на основании

- **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 в фиолетовый цвет.
- Оценка мазков, окрашенных метиленовым синим
- При микроскопии препарата видны:
  - ядра клеток, окрашенные в синий цвет;



- **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 экстрагенитальной гонореей (глотки, прямой кишки, конъюнктивы и др.);
  - сексуальных контактов пациентов с доказанной гонореей (где



- **Проведение бактериологического анализа**
- 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  $36\pm 1^\circ\text{C}$  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  $+36\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 минут.
- Клинический материал от каждого пациента должен засеиваться на отдельную чашку Петри. При использовании больших чашек (90 или 100 мм) материал из уретры и



- **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. Не редко на одной чашке можно встретить колонии разного вида.

- Большие трудности возникают при идеитификации колоний

- **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 иммуофлюоресценции (ПИФ), коагглютинации и иммуноферментного анализа являются высокочувствительными и специфичными для точной идентификации *N. gonorrhoeae*. Эти тесты могут проводиться с культурой нейссерий, выделенных при первичном посеве. При этом не требуется выделение чистой культуры гонококков, и изоляты могут быть идентифицированы на 18-24 часа раньше, чем при изучении ферментативной

- **Молекулярно-биологические методы**

- Для выявления *N. gonorrhoeae* могут 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 случаях ДНК 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 культуральный 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 бактериологическое 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 эпидемиологической 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

- **А. Проведение анализа**

- Выделение ДНК и проведение 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.

- **В. 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



- **Лабораторная диагностика**

- Для обнаружения *Tr. vaginalis* используют следующие основные методы:

- 1. Микроскопия нативных препаратов;
- 2. Микроскопия окрашенных препаратов;
- 3. Культуральный метод;
- 4. Иммунологический метод.

- **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°C предметное стекло наносят каплю теплого физиологического раствора хлорида натрия и смешивают в нем исследуемое отделяемое из очага заболевания (теплый физиологический раствор активизирует 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°C) физиологический раствор, к которому добавляется исследуемый материал, осторожно перемешивается. Покровное стекло переворачивают и накладывают каплей вниз над лункой специального предметного стекла для



- **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;

- 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 плаза,

- **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°C, поэтому перед посевом культуральную среду следует прогреть, если она хранилась в холодильнике. Следует избегать перегрева культуры выше 37-38°C, так как повышение температуры влагалищные трихомонады переносят хуже, чем понижение. Материал для исследования из очагов поражения следует брать стерильным зондом или

- **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°C 15 минут. Затем



- **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



- **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. – М. – 1999 г.
- 4. Башмакова М.А., Бочкарев Е.Г., Говорун В.М., Савицкая А. М., Парфенова Т.М. // Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению.- М., 1999.-61 с.

5. Савицкая А.М., Бочкарев Е.Г., Говорун В.М., Парфенова Т.М. // Хламидиоз. Современные подходы к диагностике и лечению.- М., 1999.-61 с.