

ПАРАЗИТОЛОГИЯ.

Практика № 1. Гельминтология. Круглые черви (нематоды). Ленточные черви. Сосальщики. Патогенные простейшие кишечника.

Гельминтологические исследования проводятся с целью диагностики гельминтозов путем обнаружения в патологическом материале яиц, личинок, взрослых гельминтов или их фрагментов. Поскольку большинство гельминтов в половозрелой стадии развития находится в желудочно-кишечном тракте или в сообщающихся с ним органах, чаще всего применяются макро- и микрогельминтоскопические методы исследования фекалий (не более суточной давности).

МАКРОГЕЛЬМИНТОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИСПРАЖНЕНИЙ

Метод отстаивания. Все порции испражнений помещают в высокую стеклянную банку, разбивают их сильной струей воды и отстаивают (гельминты опускаются на дно). Всплывшие комки, тяжи слизи извлекают и сохраняют для последующего исследования. Слив верхний слой, переносят осадок небольшими порциями в чашку Петри и на темном фоне просматривают его под лупой или невооруженным глазом. Так же невооруженным глазом и с лупой просматривают слизь, всплывшую при промывании испражнений.

Метод отсеивания – пригоден для обнаружения крупных гельминтов (аскариды, крупные ленточные паразиты, власоглавы). Перемешанные с водой фекалии помещают на систему сит с отверстиями убывающего диаметра. После промывания водопроводной водой сита переворачивают и, смыв содержимое в чашки Петри, просматривают невооруженным глазом или под лупой. Метод непригоден для мелких гельминтов (они могут проходить через сито или разрушаться).

МИКРОГЕЛЬМИНТОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используют гельминтоовоскопические и гельминтоларвоскопические методы с целью обнаружения яиц гельминтов и их личинок.

ГЕЛЬМИНТООВОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

При использовании гельминтоовоскопических методов обнаружения гельминтов вначале готовят двоякого рода мазки – нативный и толстый.

Нативный мазок. Небольшое количество фекалий растирают на предметном стекле в капле 50%-ного раствора глицерина и делают на 2/3 предметного стекла тонкий мазок. Смесь накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом (просматривают два мазка). Делая нативный мазок, следует знать, что при слабых инвазиях в нем редко обнаруживаются яйца гельминтов.

Толстый мазок с целлофаном по Като. Метод основан на обнаружении яиц гельминтов в толстом мазке кала, просветленном глицерином и подкрашенном малахитовым зеленым. Подготовленный толстый мазок фекалий покрывают кусочком целлофана, смоченного смесью рабочего раствора Като (100 мл 6%-го раствора фенола + 100 мл глицерина + 1,2 мл 3%-го раствора малахитового зеленого). Препарат исследуют через 30–60 мин, когда он слегка подсохнет и просветлится, вследствие чего яйца гельминтов легко обнаружатся под малым увеличением микроскопа. В большом мазке хорошо видны окрашенные крупные яйца гельминтов, несколько хуже – прозрачные яйца карликового цепня. Для обнаружения мелких яиц этот метод непригоден.

Методы обогащения. Среди методов обогащения используют метод флотации (всплывания) Методы флотации основаны на применении насыщенных растворов различных химических веществ, в которых яйца всплывают благодаря разнице удельного веса. Используют насыщенный раствор хлорида натрия, что дает возможность выявления яиц при небольшом их количестве. Данный метод хорошо выявляет яйца нематод и карликового цепня. Однако яйца трематод, тениид, неоплодотворенные яйца аскарид не всплывают в данном растворе. Поэтому требуется обязательно исследовать не только поверхностную пленку, но и осадок, что усложняет метод.

ГЕЛЬМИНТОЛАРВОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (выявление личинок).

В свежих пробах фекалий обычно обнаруживаются рабдитовидные личинки (т.е. личинки I стадии) кишечной угрицы (*Strongyloides stercoralis*), личинки анкилостомид, стронгилоидов. Исследуют только свежевыделенные фекалии, которые размешивают палочкой в 5-кратном количестве воды. Через 20-30 с после начала размешивания палочку быстро вынимают, образовавшуюся на ее конце каплю жидкости переносят на предметное стекло и микроскопируют.

Для яиц гельминтов характерна определенная морфологическая структура. Они имеют оболочку специфического строения, что сразу же отличает их от сходных образований, обнаруживаемых в почве, воде, осадке сточных вод, нечистотах и т.д. Яйца гельминтов содержат яйцеклетку, бластомеры, развитые личинки или желточные клетки; имеют постоянные размеры, известна и плотность некоторых из них. Краткая характеристика морфологических особенностей зародышей наиболее распространенных возбудителей болезней и описание яиц и личинок гельминтов:

Общая характеристика яиц трематод (сосальщики).

Форма яйца трематоды чаще овальная, округленная, реже удлинённая, окраска золотистая, желто-коричневая, бурая и светло-серая. На одном из полюсов у большинства яиц имеется крышечка. Внутри яйца — яйцеклетка, вокруг которой расположены желточные клетки в виде шаров или же сформировавшийся мирацидий. На наружной поверхности одних яиц имеется бугорок или шип, у других — филаменты в виде 2 нитей, идущих от полюсов.

Фасциола (*Fasciola hepatica*). У фасциол яйца овальные, очень крупные (130—145 X 70—90 мкм), желтовато-бурого цвета, имеют двухконтурную оболочку с крышечкой на одном полюсе и утолщением оболочки на противоположном; внутри яйца желточные клетки, которые заполняют все яйцо.

Описторх — яйца бледно-желтой окраски, с нежной двухконтурной тонкой, гладкой оболочкой, с крышечкой на одном полюсе и утолщением скорлупы на противоположном конце.

Шистосома кровяная (*Schistosoma haematobium*) - яйца овальные, без крышечки, с большим шипом на полюсе расположенном вдоль продольной оси яйца; размер 120—160 X 50—73 мкм.

Шистосома Мэнсона (*Schistosoma mansoni*) – яйцо в виде длинного овала с крупным боковым шипом в виде загнутого крючка, их размер 130—180 x 60—80 мкм.

Шистосома японская (*Schistosoma japonicum*)- яйца бледно-желтого цвета, овальные (в виде укороченного овала), без крышечки, с рудиментарным боковым (не постоянно) крючком; их размер 70—100 x 50—65 мкм.

Фасциолопсис (*Fasciolopsis buski*) - яйца крупные (130— 140 X 80—95 мкм), овальной формы, суженные к обоим полюсам, серовато-желтого цвета, с тонкой скорлупой. На одном полюсе яйца имеется крышечка, на другом тупое утолщение скорлупы (либо медианно, либо асимметрично).

Общая характеристика яиц цестод (ленточные). Яйца различаются по форме. Наружная оболочка у одних яиц тонкая, легко разрушается, у других толстая; внутри зародыш или онкосфера овальной формы, с эмбриональными крючками. Снаружи яйца некоторых цестод имеют филаменты в виде нитей. Окраска яиц чаще светлая, светло-желтая, реже желто-коричневая.

Лентец широкий (*Diphyllobothrium latum*) -яйцо овальное с гладкой прозрачной оболочкой желтоватого цвета. На одном полюсе яйца имеется крышечка, на другом бугорок. Размеры 70—83 x 50—54 мкм.

Вооруженный (*Taenia solium*) и невооруженный цепень (*Taenia rhynchus saginatus*). Яйца имеют тонкую прозрачную оболочку, снабженную двумя нитевидными придатками (филаментами). Внутри яйца находится зародыш (онкосфера), заключенный в толстую

двухконтурную радиально исчерченную оболочку желтовато-коричневого цвета. Размер онкосферы 28—44 x 28—38 мкм. Зародыш снабжен 3 парами крючьев.

Цепень карликовый - яйцо эллипсоидной формы с прозрачными бесцветными оболочками. В яйце находится развитая 6-крючная онкосфера. Оболочки онкосферы (размер 18—29 мкм) на полюсах прерываются, в отверстиях образуются небольшие выпячивания наружу, от которых отходят в межуточное вещество по 4 филамента, которые, по-видимому, и удерживают онкосферу в центре яйца. Размер яиц 45 x 37 мкм.

Общая характеристика яиц **нематод (круглые черви)**. Яйца различной формы и величины; чаще встречаются овальные, округлые, симметричные, но бывают бочковидные с пробочками на полюсах, вытянутые и асимметричные. Покрываются скорлупой, состоящей из нескольких оболочек, защищающих зародыш от воздействия механических и химических факторов. Наружная поверхность у одних яиц гладкая, у других ячеистая или бугристая. Окраска неодинаковая: одни из них желтовато-коричневые, другие бесцветные. Яйца выделяются во внешнюю среду в предсегментационный период, с шарами дробления и развившейся личинкой.

Аскарида - оплодотворенное яйцо овальной формы с толстой многослойной оболочкой. Наружная белковая оболочка крупнобугристая, желто-коричневого цвета. Внутри яйца шаровидный бластомер, занимающий центральное положение. Размер оплодотворенных яиц 50—70 x 40—50 мкм. Иногда яйца лишены белковой бугристой оболочки. Яйцо бесцветное или с серозеленым оттенком. Неоплодотворенное яйцо сильно вытянуто. Наружная белковая оболочка тонкая, мелкобугристая с отдельными большими и резко выступающими буграми, уплощена на полюсах, темно-желтого цвета. Содержимое яйца заполнено крупными полигональными желточными клетками. Размер неоплодотворенных яиц 50—106 X 40—50 мкм.

Власоглав (*Trichocephalus trichiurus*) - яйца бочкообразной формы с толстой многослойной оболочкой, желто-коричневого цвета. На полюсах имеются бесцветные пробочковидные образования. Внутри яйца мелкозернистое содержимое. Размер яиц 50—54 x 22—23 мкм.

Острицы (*Enterobius vermicularis*) - яйца овальной асимметричной формы, одна сторона выпуклая, другая уплощена. Оболочка гладкая, бесцветная, многослойная. Внутри яйца зародыш — на разных стадиях развития, вплоть до личинок. Размер 50—60 X 20—30 мкм.

Анкилостома (*Ancylostoma duodenale*) - яйцо овальной формы с тупозакругленными полюсами, с тонкой прозрачной оболочкой, бесцветные. Только что выделившиеся яйца имеют 1—2—4 бластомера. Размер яйца 56—60 X 34—40 мкм.

Начинающие лаборанты могут принимать за яйца гельминтов пузырьки воздуха, пыльцу хвойных деревьев, растительные клетки из непереважившейся клетчатки, имеющие подчас толстые двухконтурные оболочки. Однако эти артефакты не имеют четкой внутренней структуры, характерной для яиц гельминтов.

На объектах окружающей среды можно обнаружить и споры съедобных губчатых грибов с правильной и четкой структурой, которые напоминают яйца гельминтов, но имеют более мелкие размеры (длина до 9—15 мкм); они значительно меньше яиц власоглава.

Иногда в препаратах обнаруживаются растительные волоски, принимаемые за личинки *Strongyloides stercoralis*, но они не имеют характерного для гельминтов строения.

При исследовании объектов внешней среды необходимо дифференцировать также обнаруживающиеся в них споры, ооцисты, крахмальные зерна, имеющие некоторое сходство с яйцами гельминтов.

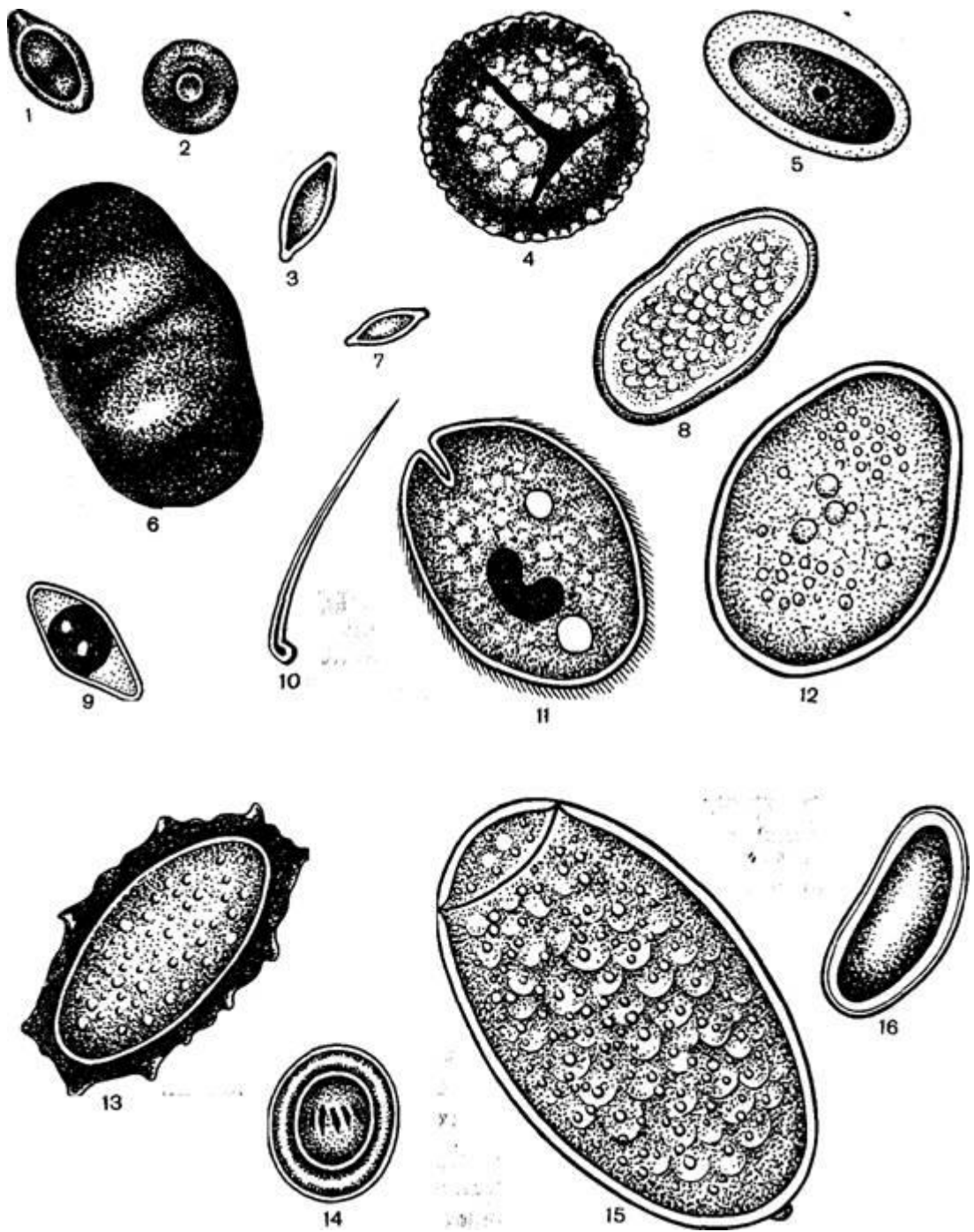


Рис. Организмы, отдельные клетки и различные образования, стимулирующие яйца и личинки гельминтов (для сравнения представлены яйца некоторых гельминтов).

1, 8 — растительная клетка; 2 — спора растений; 3 — спора сморчка; 4 — спора лишайника; 5 — яйцо колорадского жука; 6 — пыльца хвойных деревьев; 7 — спора белого гриба; 9 — ооциста кокцидий; 10 — волосок; 11 — *Balanifidium coli*; 12 — клетка картофеля; 13 — неоплодотворенное яйцо *Asc. lumbricoides*; 14 — деформированная онкосфера *Taeniidae* spec.; 15 — яйцо *Fasciola hepatica*; 16 — яйцо *Enterobius vermicularis*.

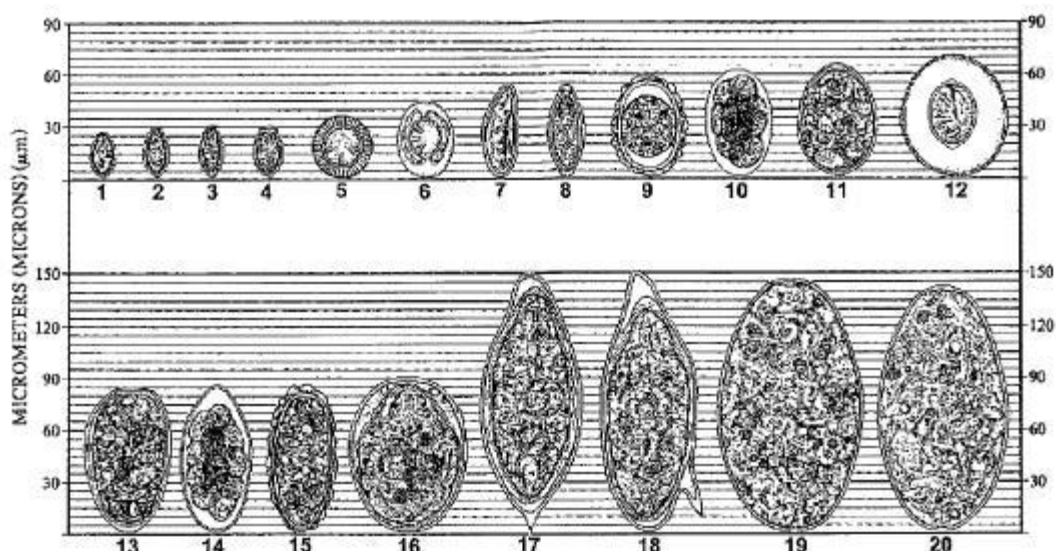


Рис.1. Размеры яиц гельминтов

1 - *Metagonimus yokogawi*, 2 - *Heterophyes heterophyes*, 3 - *Opisthorchis felineus*, 4 - *Opisthorchis (Clonorchis) sinensis*, 5 - *Taeniidae g. sp.*, 6 - *Hymenolepis nana*, 7 - *Enterobius vermicularis*, 8 - *Trichocephalus trichiurus*, 9 - *Ascaris lumbricoides* (оплодотворенное), 10 - *Ancylostomatidae sp.*, 11 - *Diphyllobothriidae g. sp.*, 12 - *Hymenolepis diminuta*, 13 - *Paragonimus westermani*, 14 - *Trichostrongylidae*, 15 - *Ascaris lumbricoides* (неоплодотворенное), 16 - *Schistosoma japonicum*, 17 - *Schistosoma haematobium*, 18 - *Schistosoma mansoni*, 19 - *Fasciola hepatica*, 20 - *Fasciolopsis buski*

Общая характеристика **личинок нематод**. Личинки удлинённые, круглые (на сечении), подвижные, светло-серого цвета или бесцветные, задний конец нередко утончённый, внутренняя структура зернистая, а у личинок старшего возраста выполнена кишечными клетками.

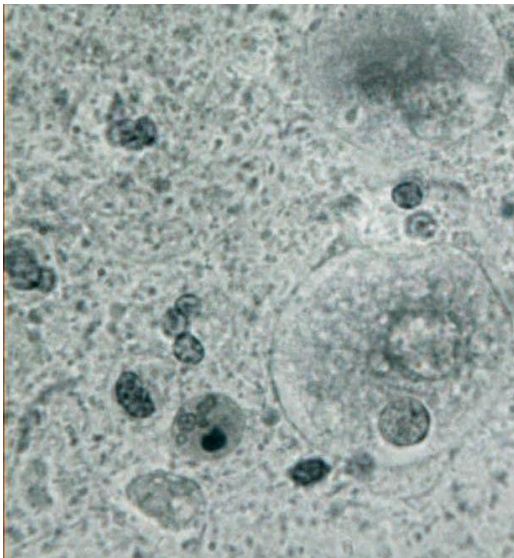
Личинки анкилостомы имеют длину около 660 мкм, длина чехлика 720 мкм, исчерченность чехлика менее выражена; ротовой выступ менее заметен; передний конец тела тупой, диаметр кишечной трубки меньше, чем бульбус пищевода, хвостовой конец тупой.

Характеристика **цист отдельных видов патогенных кишечных простейших**. В окружающей среде могут быть обнаружены цисты следующих видов патогенных кишечных простейших: дизентерийной амебы, лямблий и балантидий. Цисты каждого вида кишечных простейших отличаются друг от друга размерами, строением оболочки, морфологической структурой цитоплазмы и ядра, имеют различное количество ядер в цитоплазме.

Дизентерийная амеба (*Entamoeba histolytica*). На неокрашенных препаратах округлые, бесцветные, с двухконтурной оболочкой, диаметром 10—15 мкм. В свежем препарате заметна бесцветная оболочка.

Лямблия (*Lamblia intestinalis*). Цисты овальные, размером 10,8—16 x 6,7—10,8 мкм, средний их размер 8,3 x 11,9 мкм. Оболочка толстая, двухконтурная. В цитоплазме цист содержатся 2 или 4 ядра и свернутый жгутиковый аппарат.

Entamoeba histolytica (цисты)



Окр. по Гайденгайну, ув. 1000х

- Форма сферическая, реже овальная
- Диаметр 8-15 мкм (чаще 11-12 мкм)
- Оболочка четкая, одноконтурная
- В нативных препаратах цисты бесцветные, слегка голубоватые.
Цитоплазма мелкозернистая, с хроматоидными тельцами (белые, матовые палочки, брусочки)
- В препарате с р-ром Люголя в цистах видны круглые ядра (от 1 до 4) с центрально расположенной кариосомой.
В 1 – 2-х ядерных цистах – гликогеновая вакуоль окрашенная в светло - коричневый цвет
- В препаратах, окрашенных по Гайденгайну, цисты выглядят как в препарате с р-ром Люголя, но не видна гликогеновая вакуоль, а хроматоидные тельца окрашены в черный цвет

Lambliа intestinalis (трофозоит)

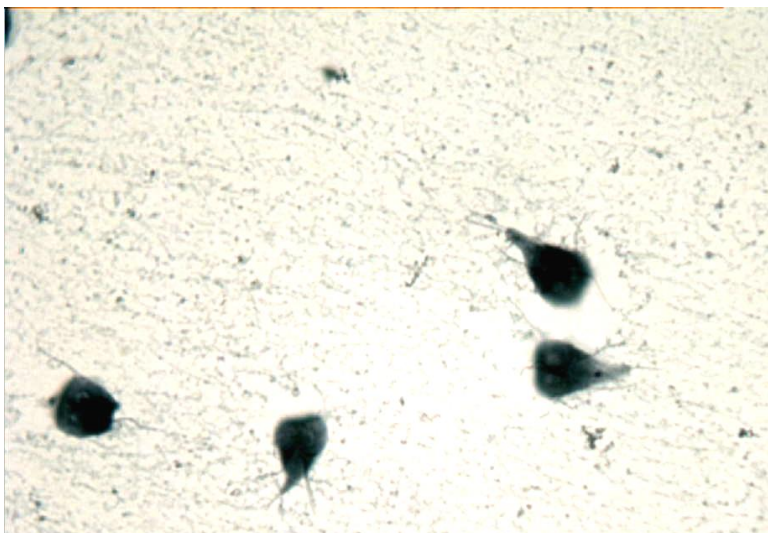
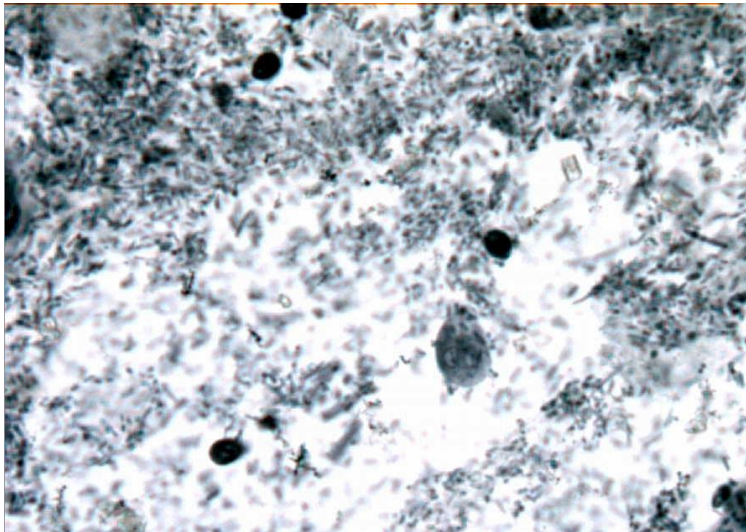
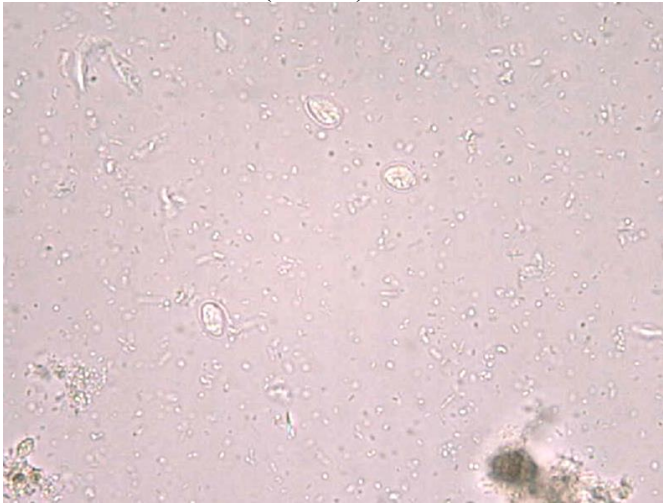


Рис. 1 - в кале

Рис. 2 - в желчи

- Размер: длина -10-20 ширина 5-15 мкм
- Клетка грушевидной формы, разделена аксостилем на 2 равные части
- Движение осуществляется при помощи 4-х пар жгутиков, активное, поступательно-колебательное.
- В препарате с р-ром Люголя цитоплазма окрашена в золотисто-коричневый цвет, на суженном конце – жгутики, в расширенной части – 2 симметрично расположенных блестящих ядра в виде точек, вдоль тела проходит аксостиль (ув.400х).
- При окраске по Гайденгайну цитоплазма серая, широкая часть окрашена светлее, содержит 2 овальных ядра с крупными кариосомами. Аксостиль в виде черной линии проходит вдоль тела, жгутики окрашены в черный цвет (ув.1000х).

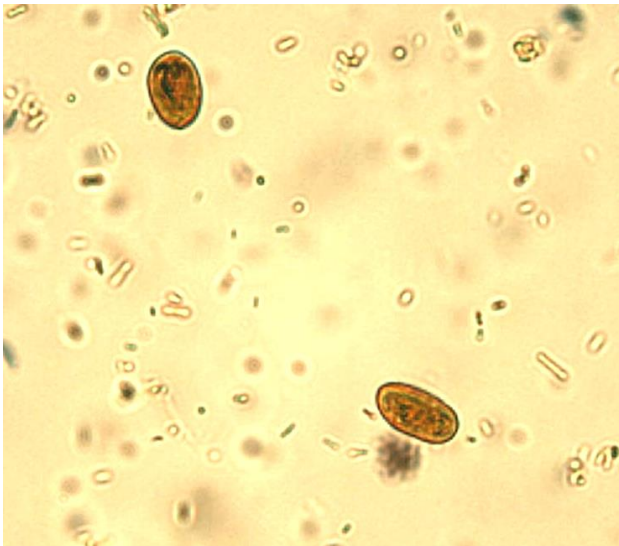
Lambliа intestinalis (цисты)



Ув. 400х



Ув. 1000х

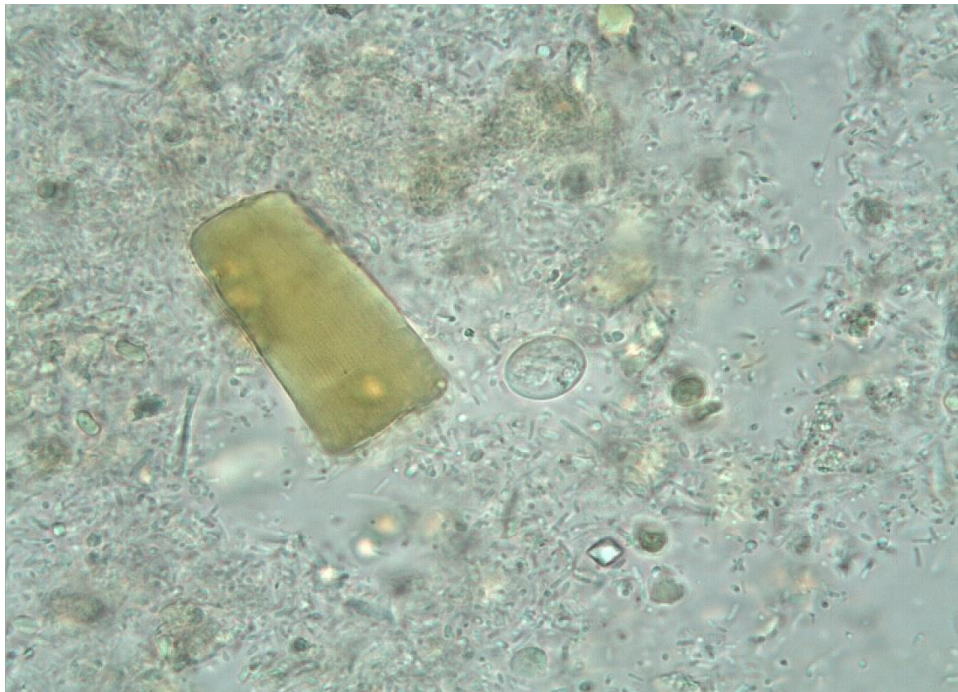


Ув. 1000х

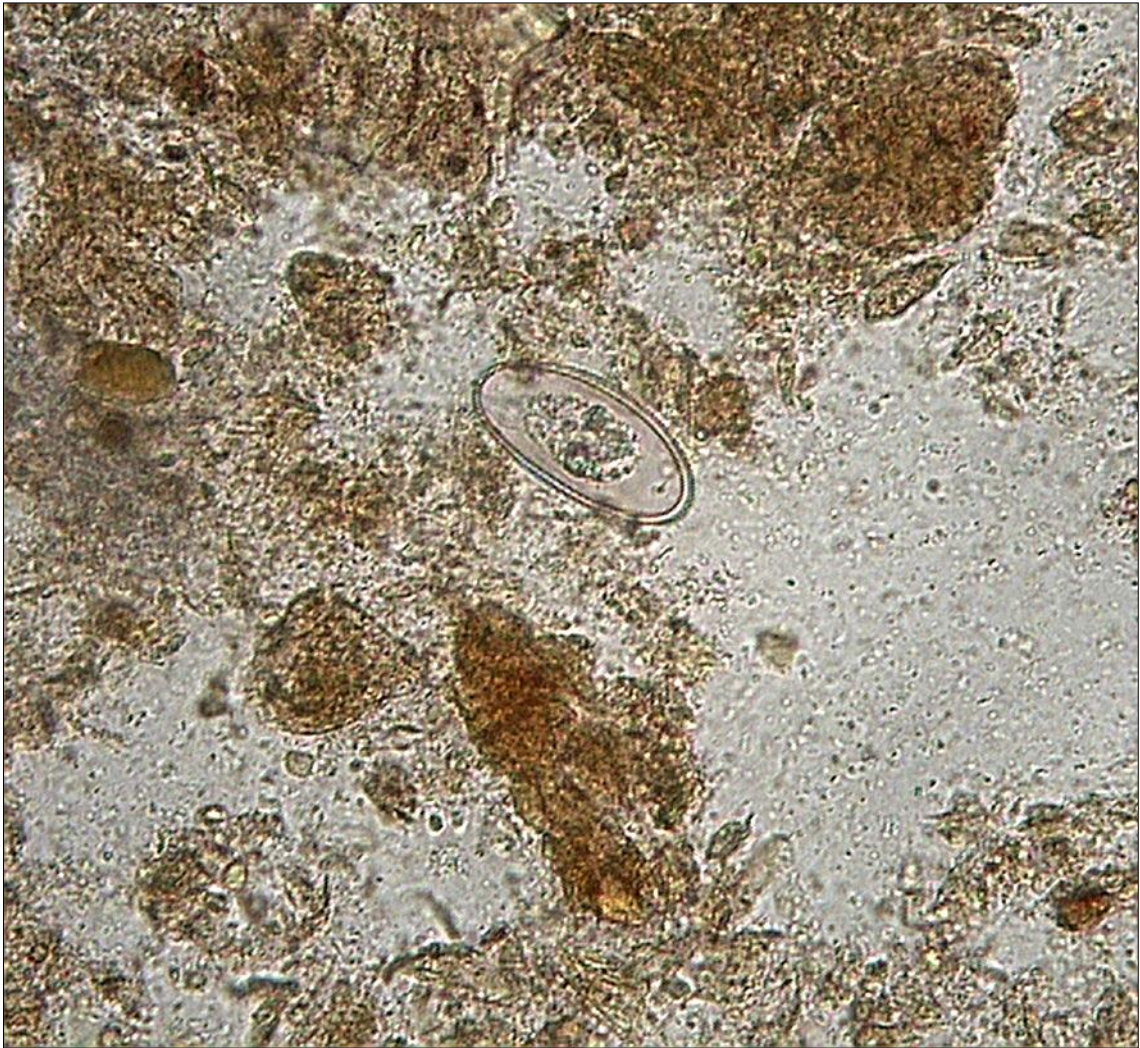
Р-р Люголя

- Размер: длина 8-14, ширина 7-10 мкм (ув.400х)
- Форма овальная
- Оболочка двойная, хорошо выражена.
- Внутри цисты видны ядра, аксостиль и закрученные жгутики (ув.1000х).

- В препарате с р-ром Люголя оболочка не окрашивается, цитоплазма золотисто-коричневая, ядра (2-4) в виде блестящих точек в различных участках цитоплазмы, жгутики и аксостиль видны.
- При окраске по Гайденгайну – на фоне серой цитоплазмы видны ядра, аксостиль и закрученные жгутики, вокруг цитоплазмы просветление, оболочка не окрашивается (ув.1000х).



Цисты лямблий в каловой эмульсии.



Яйца острицы продолговатой, несколько асимметричной формы, покрыты тонкой двухконтурной бесцветной, гладкой оболочкой. В зрелых яйцах содержатся личинка.



Яйца власоглава имеют удлиненную форму, напоминающую лимон или бочку со светлыми «пробочками» на полюсах, покрыты толстой многослойной оболочкой и окрашены в коричневый цвет.



Оплодотворенное яйцо аскариды имеет обычно овальную форму, покрыто толстой многослойной оболочкой, которая окрашивается стеркобилином в коричневый цвет. Внутри расположен мелкозернистый шаровидный бластомер и имеются свободные от него полюса. Оплодотворенные яйца часто имеют наружную белковую оболочку - неровную, крупнобугристую, фестончатую.



Неоплодотворенные яйца аскариды могут иметь разнообразную форму, чаще удлиненные, реже грушевидные, трехгранные, в виде «туфли». Несколько крупнее оплодотворенных. Все содержимое яйца заполнено крупными желточными клетками, полюсов нет. Яйца могут иметь грубую наружную белковую оболочку.



Рабдитовидная личинка кишечной угрицы имеет короткую ротовую полость, пищевод занимает 1/3 тела с 2 расширениями, отчетливо виден крупный половой зачаток. Хвост заострен. Размер 200-300x15-18 мкм.



Филляриевидная личинка кишечной угрицы имеет пищевод, занимающий 1/2 тела без расширений, хвостовой конец расщеплен. Размер 500x14-20 мкм.



Яйца тениид имеют тонкую прозрачную оболочку, внутри которой помещается зародыш (онкосфера), окруженная толстой двухконтурной радиально исчерченной оболочкой желтовато-коричневого цвета. В центре онкосферы находится 3 пары крючьев. Размер 28-44x28-38 мкм. При обнаружении онкосфер, в заключении указывают «онкосферы тениид» или онкосферы spp.



Яйца (дифиллоботриоз) крупные, овальной формы, серого, серовато-желтого цвета. На одном из полюсов имеется крышечка, на противоположном – утолщение в виде бугорка. Оболочка двухконтурная, в центре яйца расположена зародышевая клетка, окруженная множеством желточных клеток. Размер 70-83x50-54 мкм.



Яйцо (шистосомоз) овальное, удлиненное. Оболочка двухконтурная, желтоватая, крышечки не имеет. На боковой поверхности крупный загнутый шип. Внутри яйца – сформировавшийся мирацидий. 130-180x60-80 мкм



Яйца (описторхоз) мелкие, бледно-желтые, почти бесцветные, с нежной гладкой двух-контурной оболочкой. На слегка суженном полюсе – крышечка, на противоположном полюсе – мелкое конусовидное утолщение оболочки. Размер 23-34x10-19 мкм.