

Занятие 9

Классификация, морфология и ультраструктура простейших, вызывающих заболевания у человека. Методы изучения морфологии простейших. Методы диагностики паразитарных инфекций. Микроскопический паразитологический серологический биологический и молекулярно-генетический методы

Цель занятия: Ознакомить студентов с морфо-биологическими свойствами патогенных простейших, дать информацию о методах диагностики (микроскопический, паразитологический, биологический, серологический, кожно-аллергический и молекулярно-генетический) протозоозов.

План занятия:

Классификация простейших:

Морфо-биологические свойства типа *Sarcomastigophora*

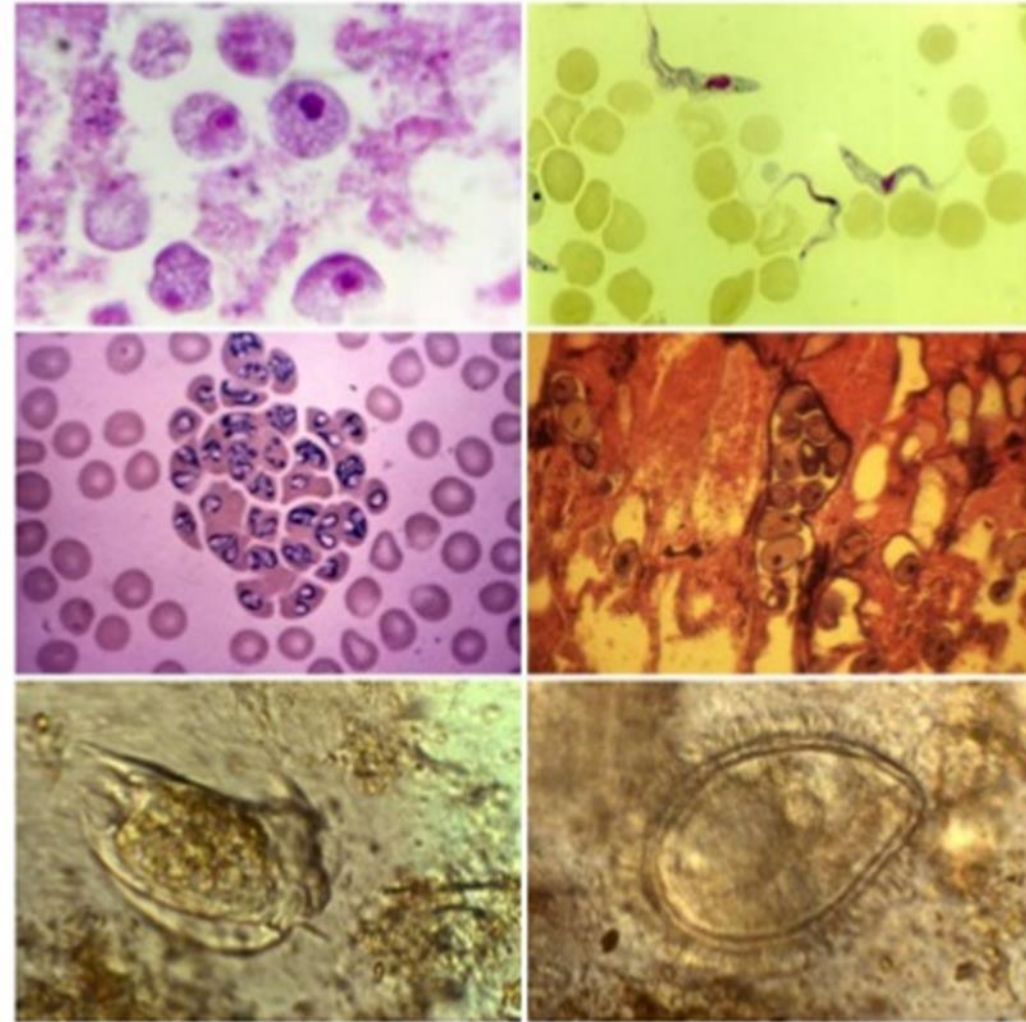
Морфо-биологические свойства типа *Apicomplexa*

Морфо-биологические свойства типа *Ciliophora*

Морфо-биологические свойства типа *Microspora*

Методы диагностики (микроскопический, паразитологический, биологический, серологический, кожно-аллергический и молекулярно-генетический) протозоозов.

- Простейшие — одноклеточные эукариоты с размерами в пределах 2-100 мкм. Представители царства *Animalia* (животные) и подцарства *Protozoa*.
- Раздел микробиологии, изучающий простейших называется протозоологией, а заболевания, вызываемые ими — протозоозами или паразитарными заболеваниями (инвазиями).



PROTOZOA

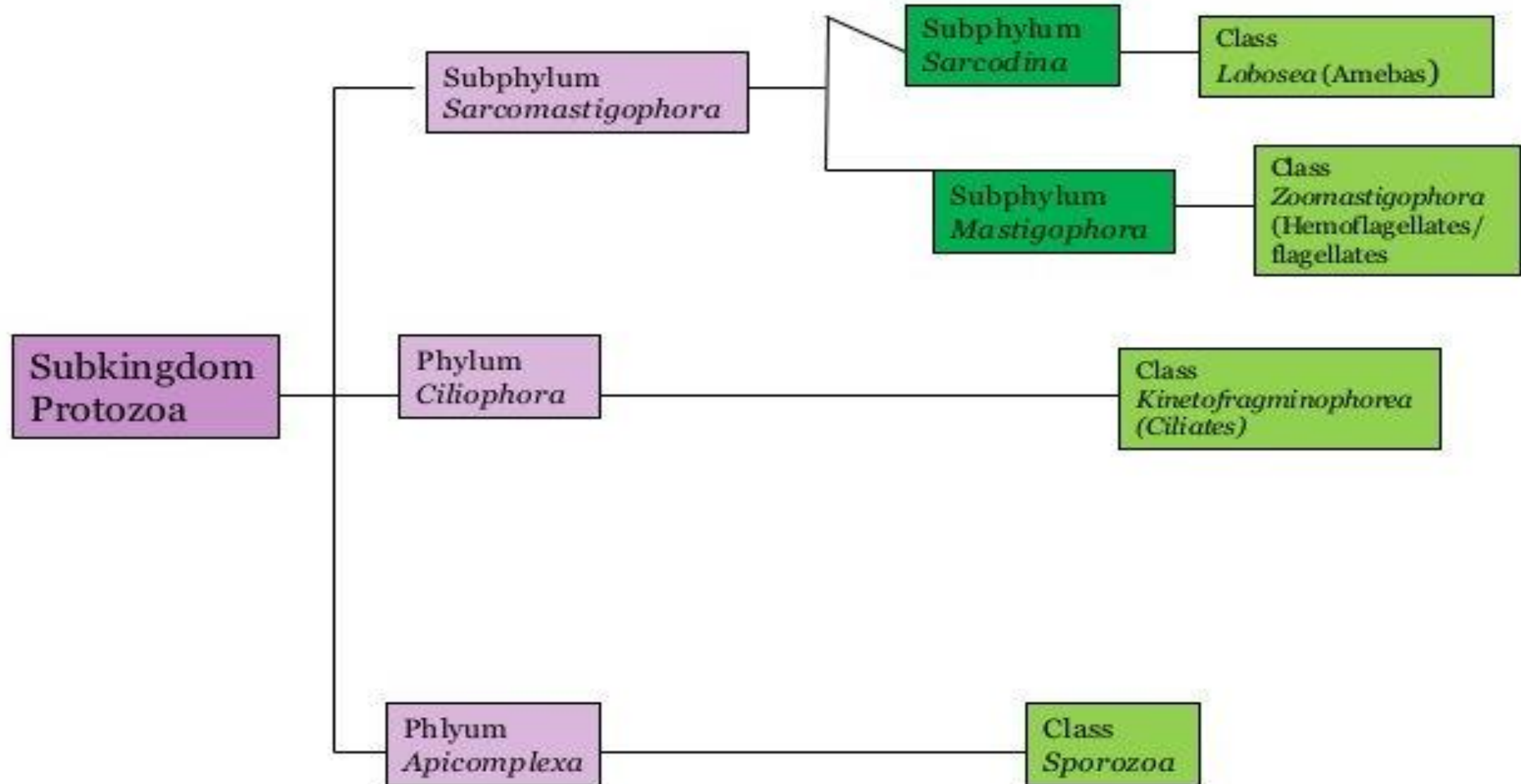
- ***Протозоология*** — являясь наукой о простейших одноклеточных, изучает морфологию, идентификацию, пути заражения, патогенез, диагностику, специфическую и патогенетическую терапию, профилактику простейших.
- ***Протозозы*** - заболевания, вызываемые паразитами, простейшими организмами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ

По органеллам движения:

- *Sarcomastigophorae,*
- *Apicomplexa*
- *Ciliophora ,*
- *Microspora*

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ

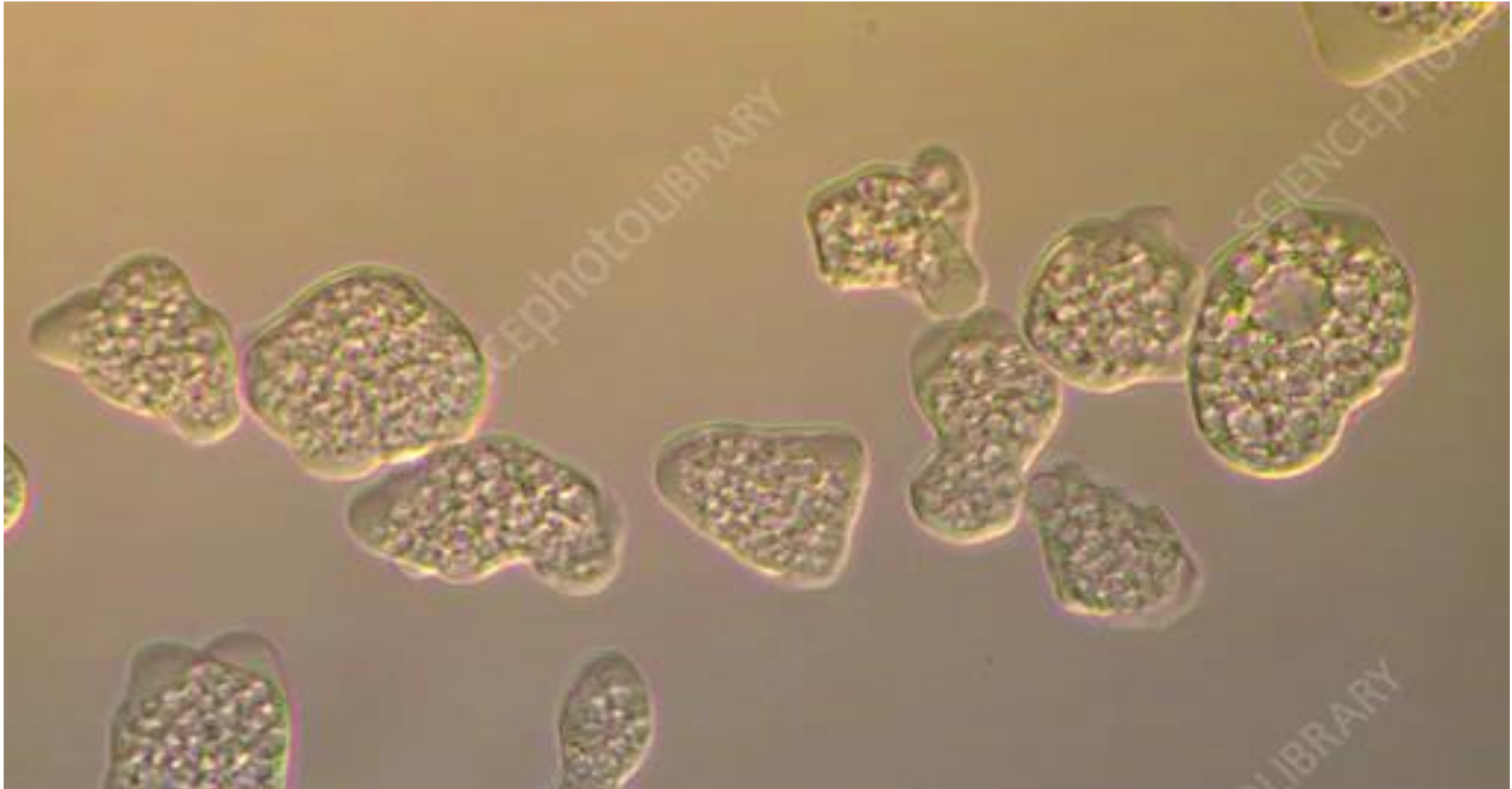


- Taxonomy

- Kingdom
- Phylum (pl: Phyla)
- Class
- Order
- Family
- Genus (pl: Genera)
- Species (pl: Species)

Entamoeba histolytica

(образование псевдоподий)



Trichomonas vaginalis

(микроскопия осадка мочи)



<http://10minus6cosm.tumblr.com>

ПАРАЗИТ – организмы, постоянно и временно проживающее внутри и приносящие вред более сильному и большому растительному, животному и человеческому организму. Если микроорганизм паразитирует внутри другого и использует его как источник питания это называется паразитизмом.

САПРОФИТЫ – утилизируют разложившиеся растительные остатки

SAPROZOA – организмы, живущие в животных остатках, но не паразитирующие в них.

ХОЗЯИН - организм носящий паразит.

ПАРАЗИТОЛОГИЯ – изучает симбиоз между двумя живыми – ПАРАЗИТОМ и ХОЗЯИНОМ.

Паразитология изучает морфологию, физиологию, биологию, серологию, иммунологию, диагноз и лечение протозоозов.

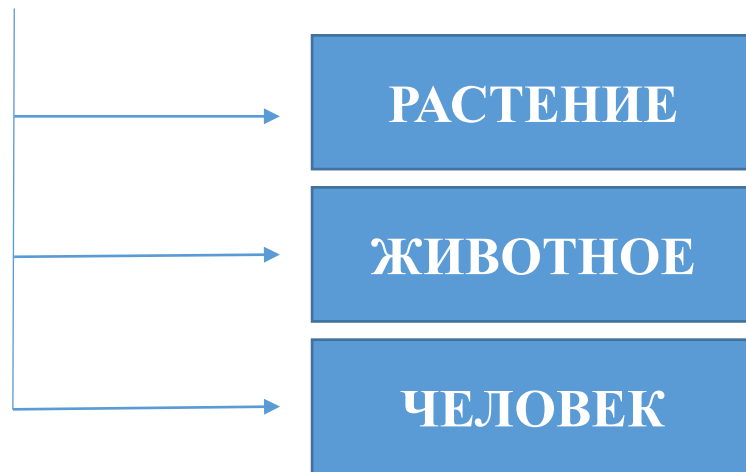
ОБЛАСТИ ПАРАЗИТОЛОГИИ:

- *Паразитология растений*
- *Медицинская паразитология*
- *Ветеринарная паразитология*

КЛАССИФИКАЦИЯ ПАРАЗИТОВ



ОСНОВНОЙ ОРГАНИЗМ



ПРОИСХОЖДЕНИЕ

```
graph TD; A[ПРОИСХОЖДЕНИЕ] --> B[РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (ФИТОПАРАЗИТЫ)]; A --> C[ЖИВОТНЫЕ (ЗООПАРАЗИТЫ)]; B --> D[ГРИБКИ (FUNGUS) МИКОЛОГИЯ]; B --> E[БАКТЕРИИ (БАКТЕРИОЛОГИЯ)]; B --> F[ВИРУСЫ (ВИРУСОЛОГИЯ)]; C --> G[ПРОСТЕЙШИЕ (ПРОТОЗООЛОГИЯ)]; C --> H[МЕТАЗОА]; H --> I[ГЕЛЬМИНТЫ (ГЕЛЬМИНТОЛОГИЯ)]; H --> J[АРТРОПОДЫ (АРТРОПОДОЛОГИЯ)];
```

РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (ФИТОПАРАЗИТЫ)

ГРИБКИ (FUNGUS)
МИКОЛОГИЯ

БАКТЕРИИ
(БАКТЕРИОЛОГИЯ)

ВИРУСЫ
(ВИРУСОЛОГИЯ)

ЖИВОТНЫЕ (ЗООПАРАЗИТЫ)

ПРОСТЕЙШИЕ
(ПРОТОЗООЛОГИЯ)

МЕТАЗОА

ГЕЛЬМИНТЫ
(ГЕЛЬМИНТОЛОГИЯ)

АРТРОПОДЫ
(АРТРОПОДОЛОГИЯ)

РАЗМЕР

```
graph TD; A[РАЗМЕР] --> B[МИКРОПАРАЗИТЫ]; A --> C[МАКРОПАРАЗИТЫ]; B --> D[БАКТЕРИИ]; B --> E[ВИРУСЫ]; B --> F[ГРИБКИ]; B --> G[ПРОСТЕЙШИЕ]; C --> H[ГЕЛЬМИНТЫ]; C --> I[АРТРОПОДЫ];
```

МИКРОПАРАЗИТЫ

МАКРОПАРАЗИТЫ

БАКТЕРИИ

ГЕЛЬМИНТЫ

ВИРУСЫ

АРТРОПОДЫ

ГРИБКИ

ПРОСТЕЙШИЕ

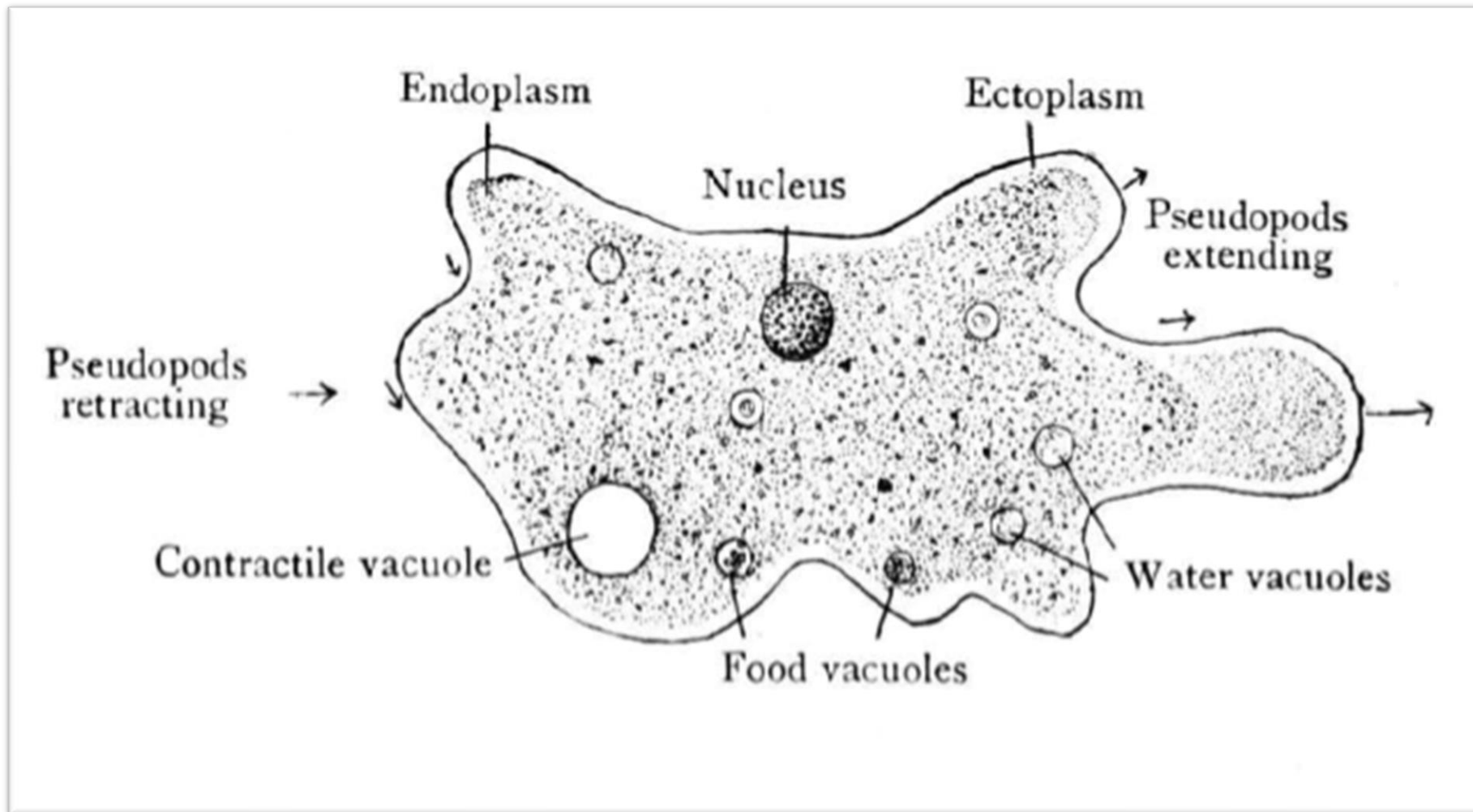
Протозоозы

По локализации инфекций протозоозы делятся на 2 группы:

- *Кишечные и урогенитальные протозоозы- гиардиоз, амебиаз, балантидиаз, криптоспоридиоз, микроспоридиоз, трихомониаз;*
- *Протозоозы крови и мягких тканей- малярия, токсоплазмоз, лейшманиоз, трипаносомоз.*

Морфология простейших

- Простейшие являются одноклеточными организмами.
- Относятся к царству Protozoa домену Eukaria и обладают строением, свойственным эукариотам.
- Обладают ядром, кариолимфой, хроматином(хромосомой) и ядрышком.
- Пелликула — эластическая мембрана, являющаяся периферическим слоем цитоплазмы, придает форму простейшим.
- Вегетативные формы неустойчивы в окружающей среде. Для поддержания жизнедеятельности они переходят в форму цист. Цисты сохраняют свои биологические свойства долгое время. При благоприятных условиях переходят из цист в вегетативную форму и размножаются.



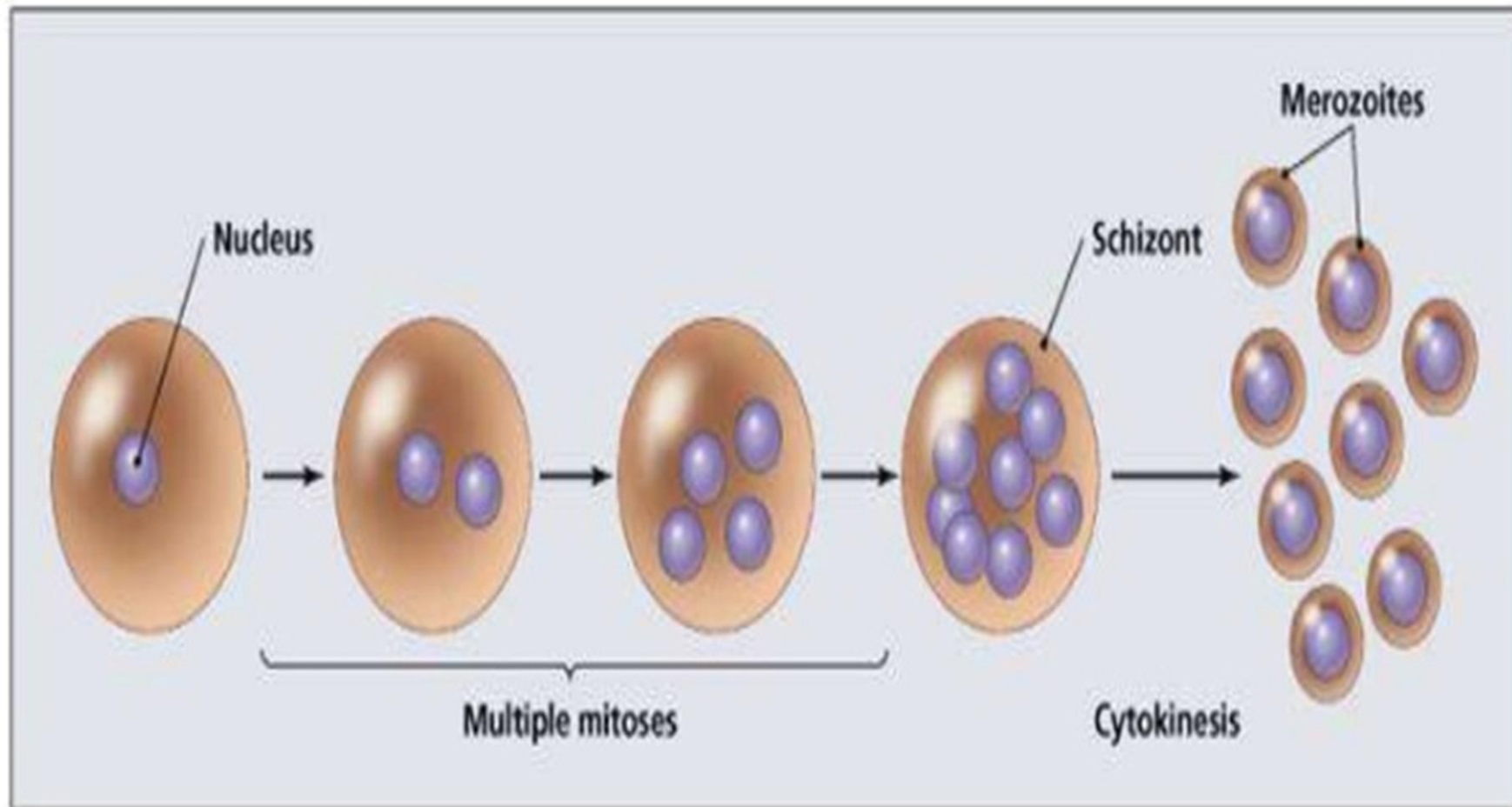
Эктоплазма – орган передвижения, питания, защиты.

Эндоплазма – ядро, митохондрии и питательные вещества.

Простейшие:

- подвижность (жгутики, реснички, псевдоподии)
- питание (питательные вакуоли)
- выделение (сократительная вакуоль).
- Питаются посредством фагоцитоза специализированных структур.
- Некоторые простейшие обладают опорными фибриллами.
- Размножаются бесполым (делением надвое и множественным делением ядра) и половым(спорогония) способами.

Schizogony



ENTAMOEBA HISTOLYTICA

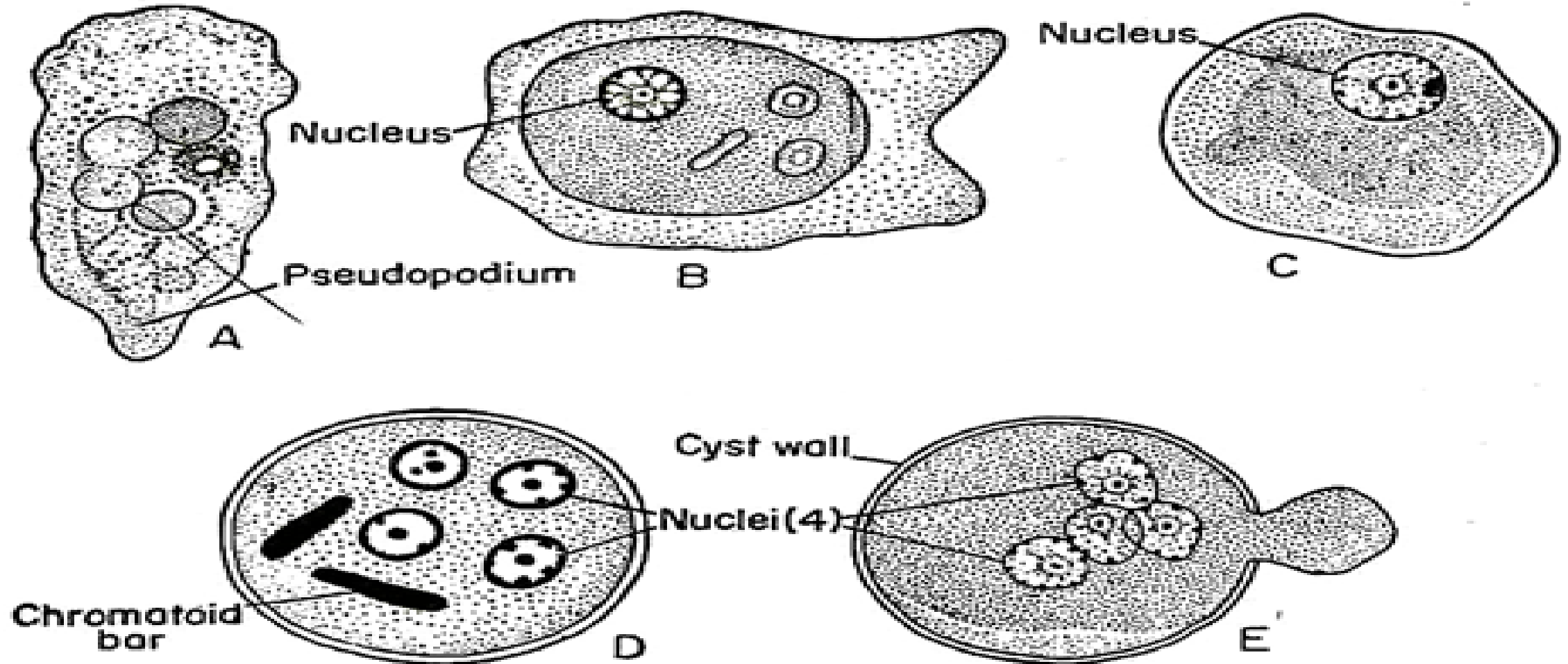
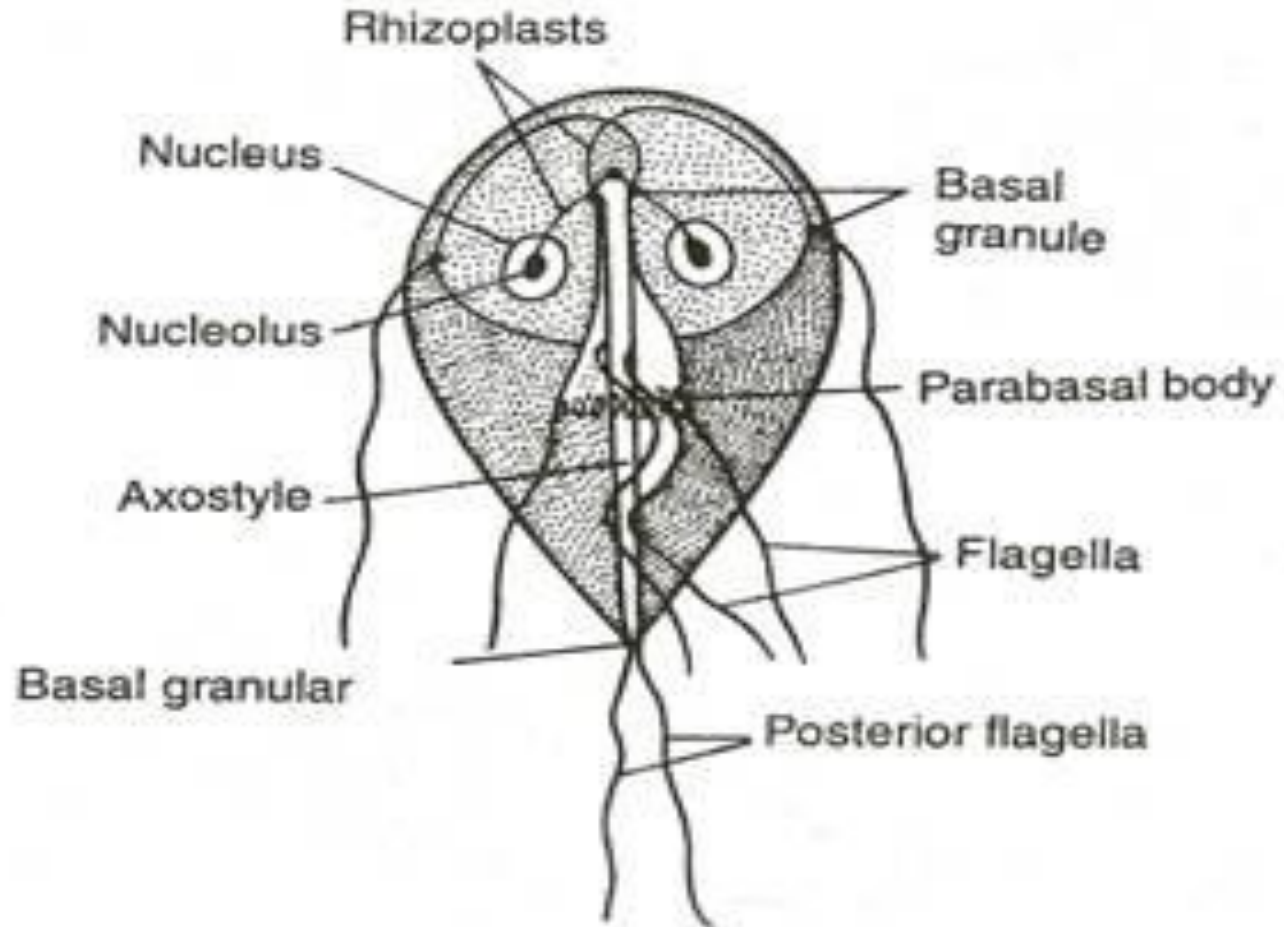


Fig. 50A. *Entamoeba histolytica*—Trophozoite—living (A) and Stained (B), Precystic stage, (C), Cyst (D), Emergence (E).

GIARDIA LAMBLIA



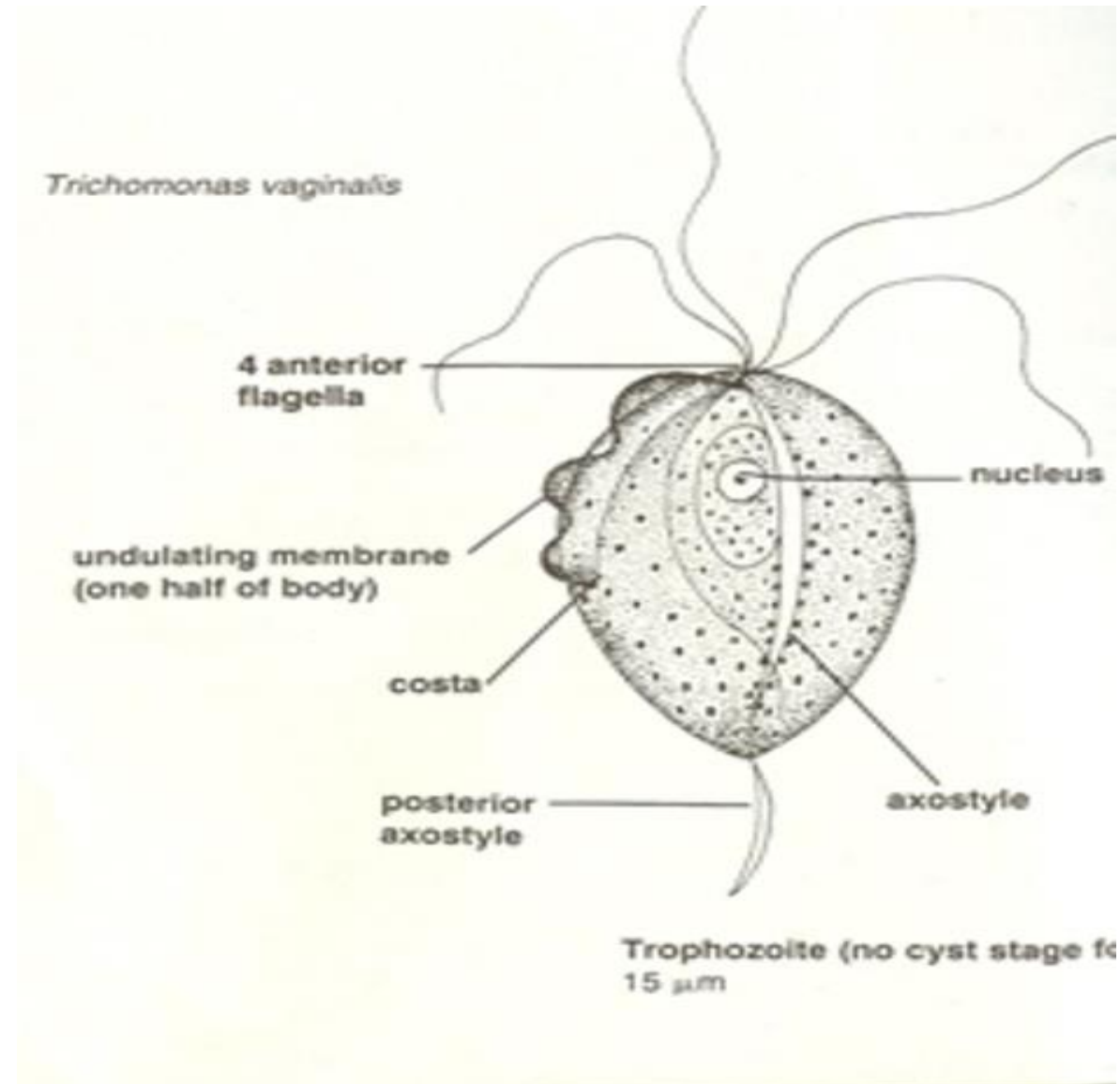
Trophozoite



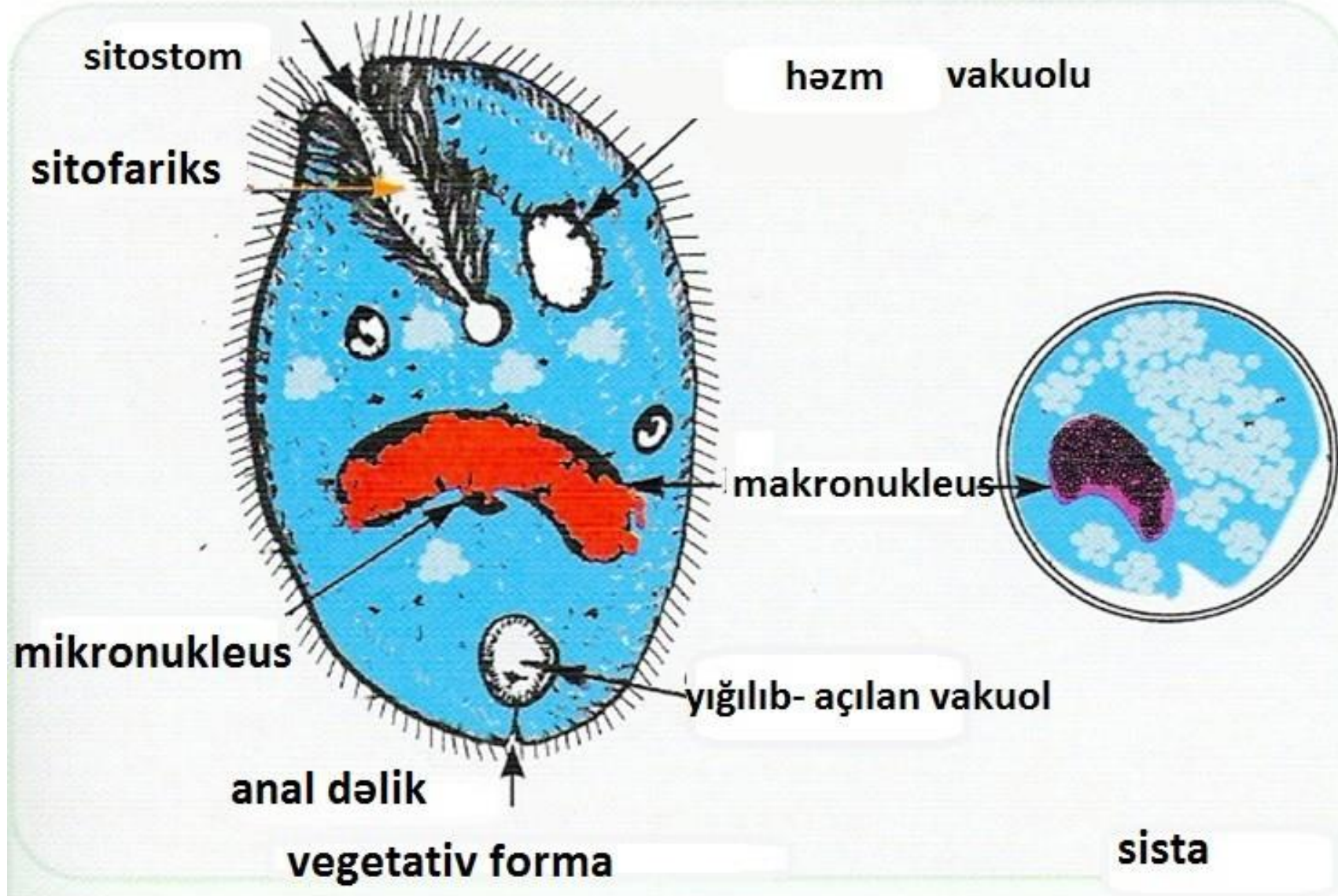
Cyst

Fig. 181. Stages of life cycle of *Giardia intestinalis*.

TRICHOMONAS VAGINALIS



BALANTIDIUM COLI



Изучение морфологии простейших:

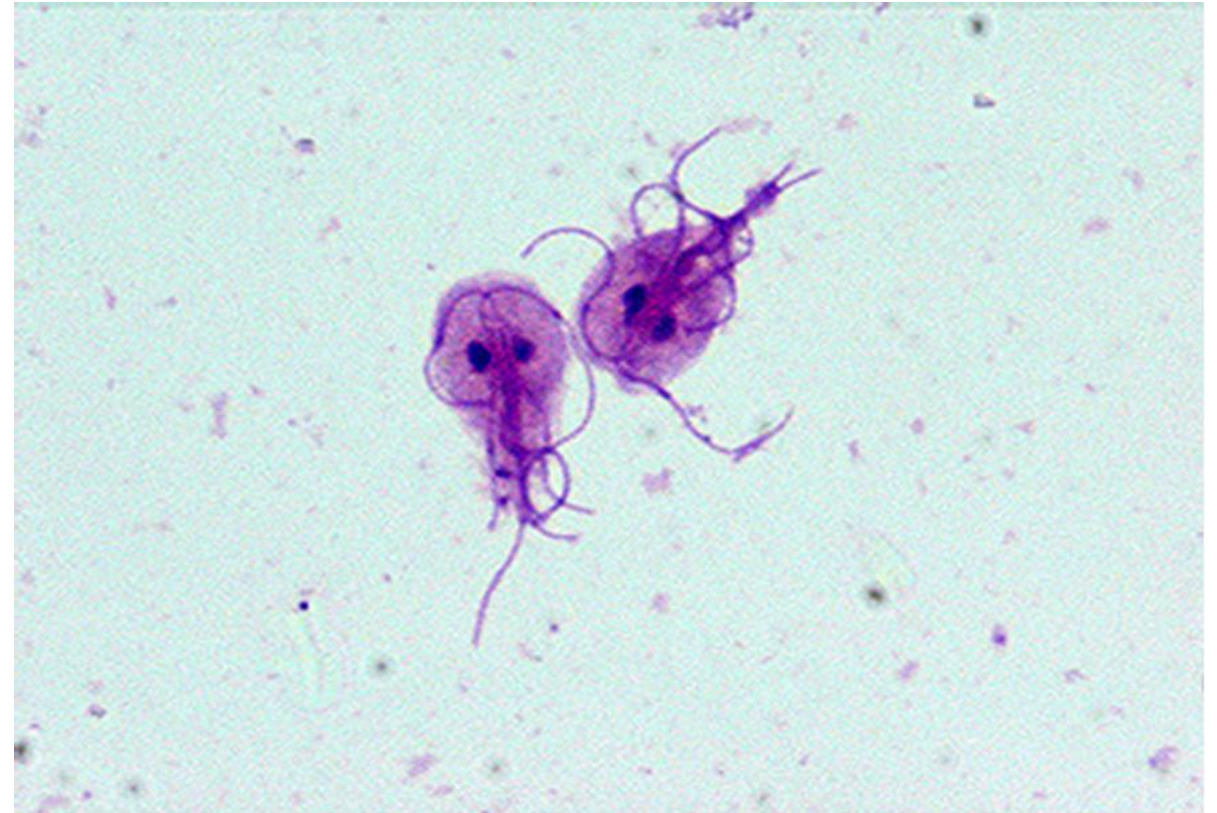
Микроскопический метод:

- Готовится нативный мазок из патологического материала в физиологическом растворе и Люголе и просматривается под 10х и 40х объективами микроскопа.
- Готовится мазок из патологического материала, производится фиксация мазка химическим методом (этиловый спирт, метиловый спирт, смесь Никифорова) и окрашивание по **Романовскому-Гимзе**. Ядра простейших окрашиваются в красный, цитоплазма – в голубой цвет.

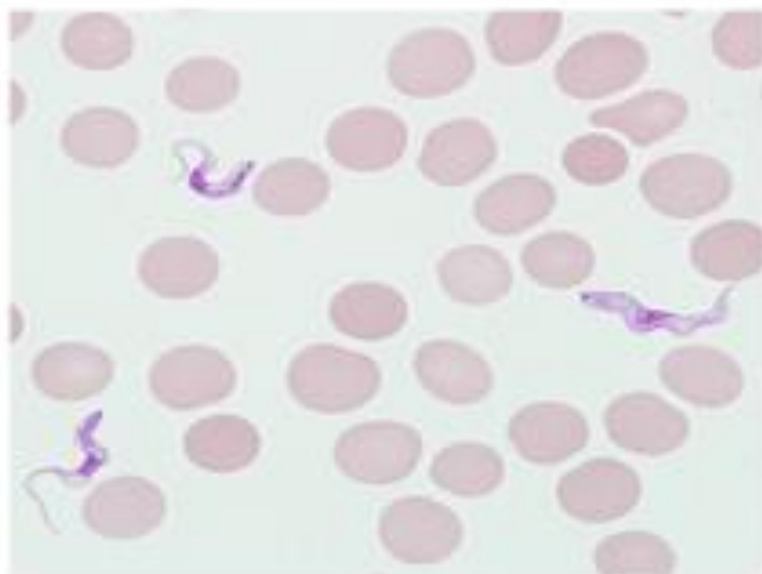
Окрашивание по Гимза



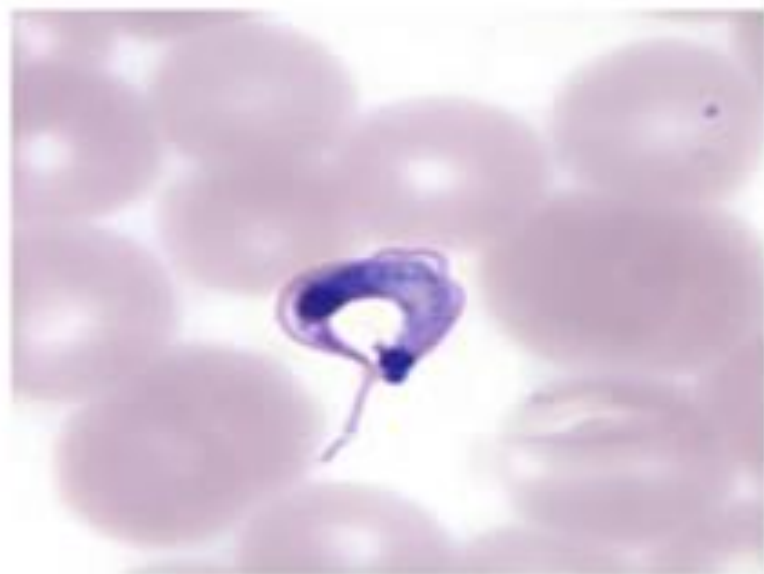
Trypanosoma brucei



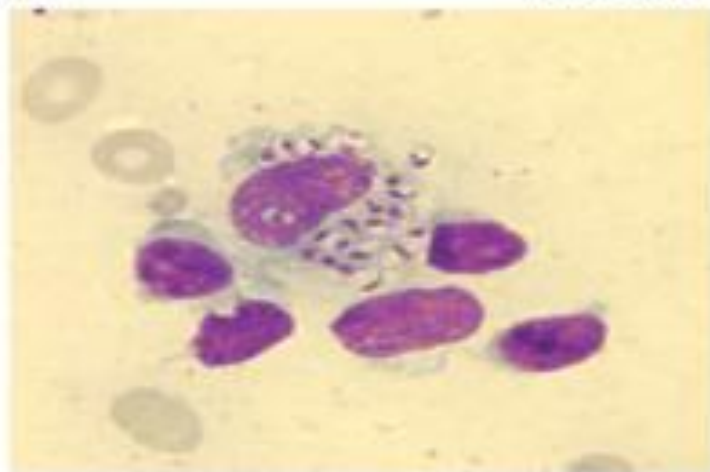
Trichomonas vaginalis



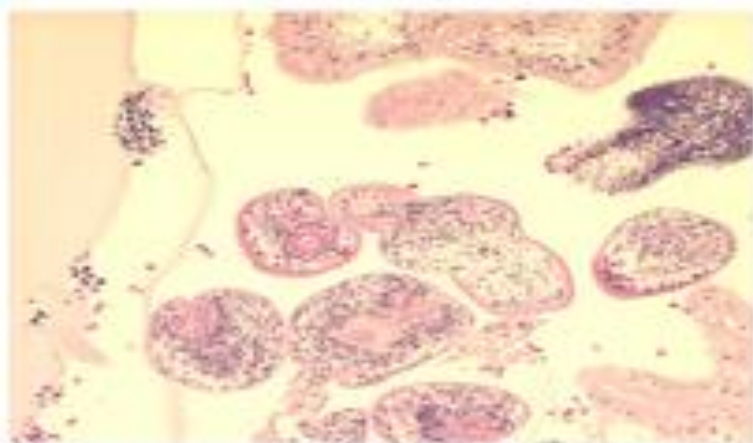
Trypanosoma brucei ssp. in a thin blood smear stained with Giemsa.



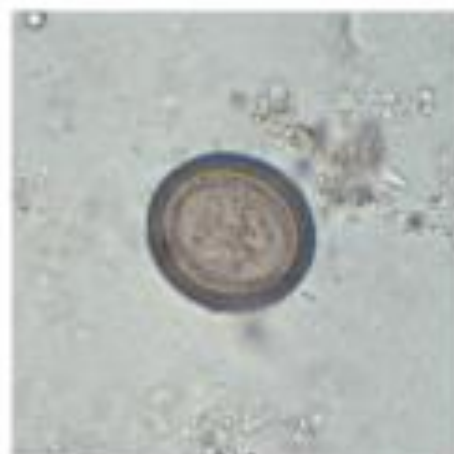
T. cruzi trypomastigote in a thin blood smear stained with Giemsa.



Leishmania sp. amastigotes in a Giemsa-stained tissue scraping



Protoscoleces in a hydatid cyst removed from lung tissue, stained with hematoxylin and eosin (H&E).



Taenia sp. egg in unstained wet mounts



Proglottid of *T. saginata* injected with India Ink



Egg of *S. haematobium* in a wet mount of a urine concentrate



Egg of *S. mansoni* in unstained wet mounts.



Egg of *S. japonicum* in an unstained wet mount of stool.



Egg of *F. hepatica* in an unstained wet mount



**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ
ПАРАЗИТАРНЫХ ИНВАЗИЯХ: МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ,
ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ, БИОЛОГИЧЕСКИЙ,
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ,**

ПАРАЗИТАРНЫЕ ИНВАЗИИ

Disease	Causative Agent
Malaria	Plasmodium (P. Falciparum, P. Oval, P. Vivax, P.malariae)
Giardiasis (diarrhea)	Giardia intestinalis
Amoebic Dysentery	Entamoeba histolytica
Toxoplasmosis (immune deficiency)	Toxoplasma Gondii
Cryptosporidiosis	Cryptosporidia
Sleeping sickness	Trypanosoma
Leishmaniasis (kala-azar)	Leishmania

Названия инвазий образуются добавлением суффикса к названию рода паразита:

- OSE (Ascariose)
- IOSIS (Ascariosis)
- İASİS (Askariasis)
- İASE (Askariase)

Пути инвазии паразитов

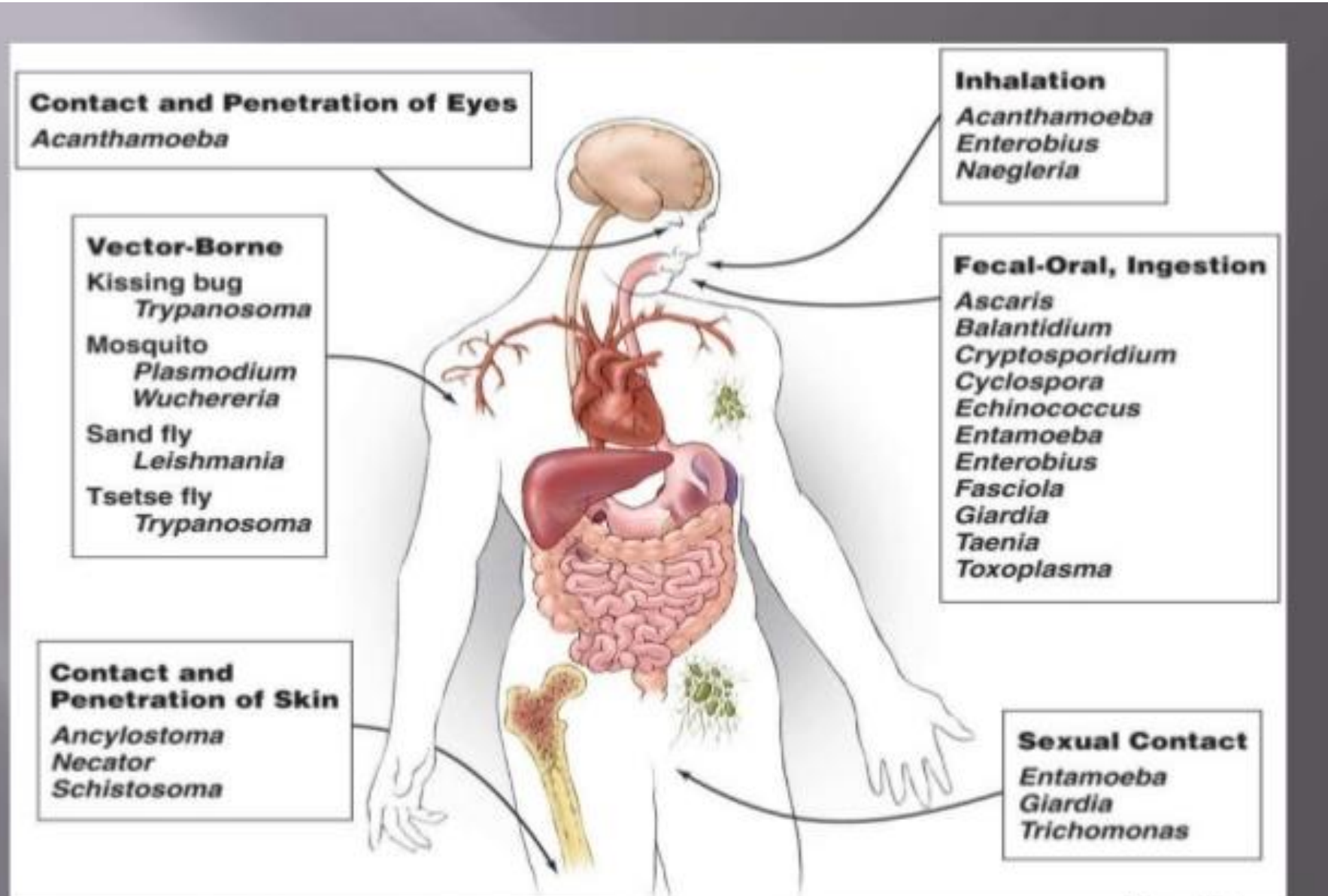
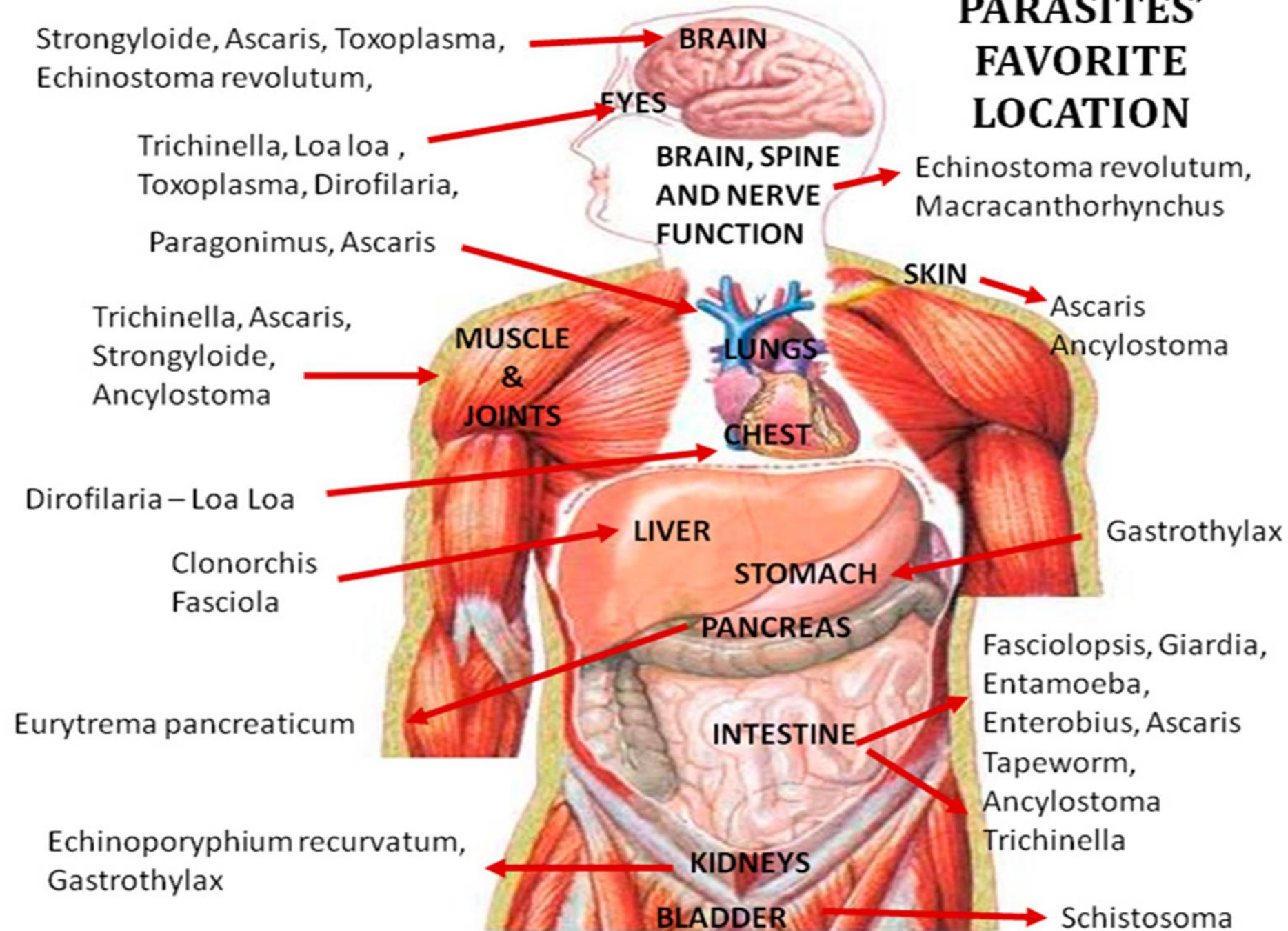


Figure 23.1

PARASITES' FAVORITE LOCATION



ДИАГНОСТИКА ПАРАЗИТАРНЫХ ИНВАЗИЙ

- Клиническая
- Лабораторная

Цель лабораторного диагноза:

- Подтверждение предварительного клинического диагноза;
- Идентификация паразитарной инвазии

Материал исследования—

берется в зависимости от очага патологии.

- Кал
- Кровь
- Сыворотка/плазма
- Другие (анальный соскоб, дуоденальное содержимое, мокрота, моча, урогенитальный мазок)
- Ткани и аспираты

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- **МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ**
- **ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ**
- **БИОЛОГИЧЕСКИЙ (КСЕНОДИАГНОСТИКА)**
- **СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ**
- **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ**

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД:

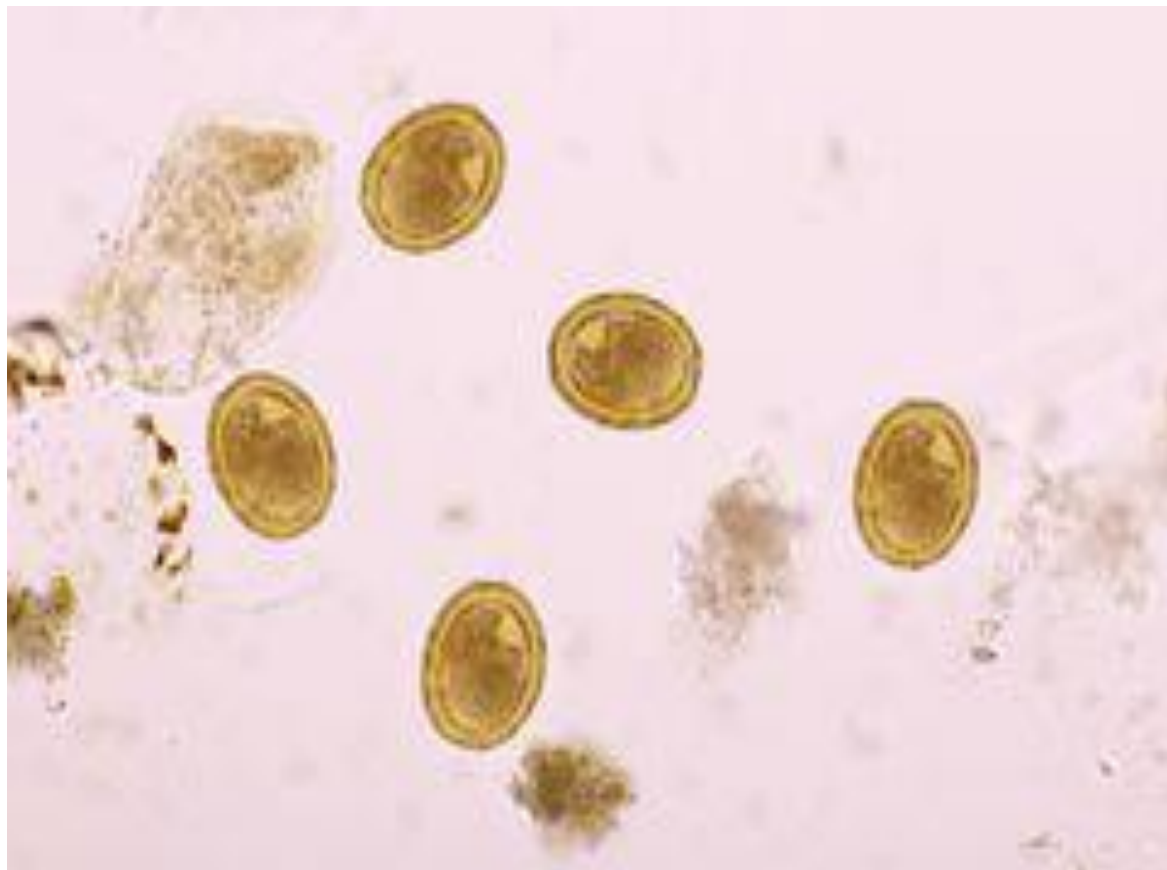
Нативная микроскопия (препарат «раздавленная капля»)

- Готовится тонкослойная эмульсия кала.
- К эмульсии добавляется раствор Люголя (для определения включений гликогена) или физиологический раствор.
- Микроскопия под 10х и 40х объективами.
- Находятся трофозоиты (вегетативные), цисты, яйца и личинки гельминтов, слизь, лейкоциты, эритроциты, кристаллы (Шарко-Лейдена), элементы пищеварения и т.д.

Окрашивание — используется для определения паразитов.

- Люголь
- Giemsa и Wright
- Гематоксилин (Wheatley трихром краска)

Яйца гельминтов в препарате «раздавленная капля», увеличение x400

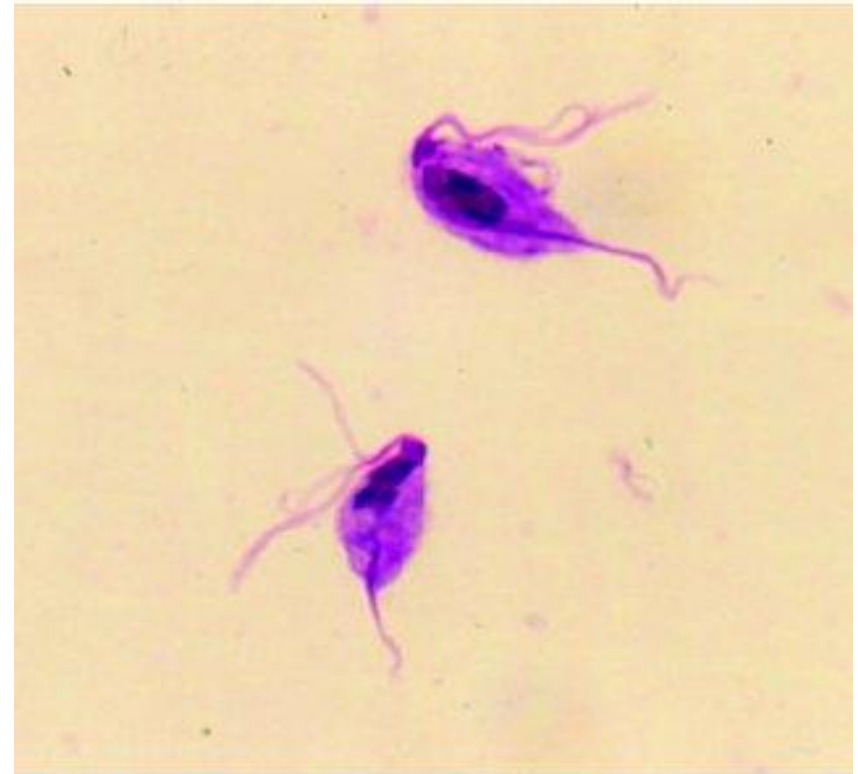
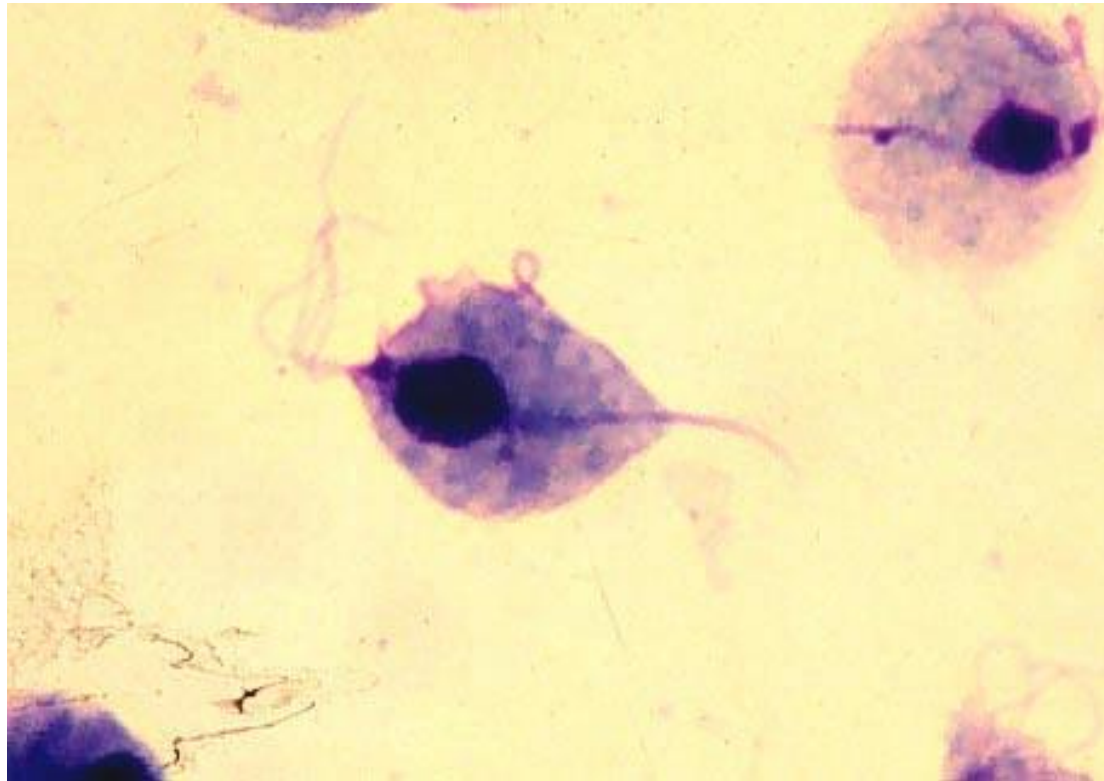


Ascaris lumbricoides



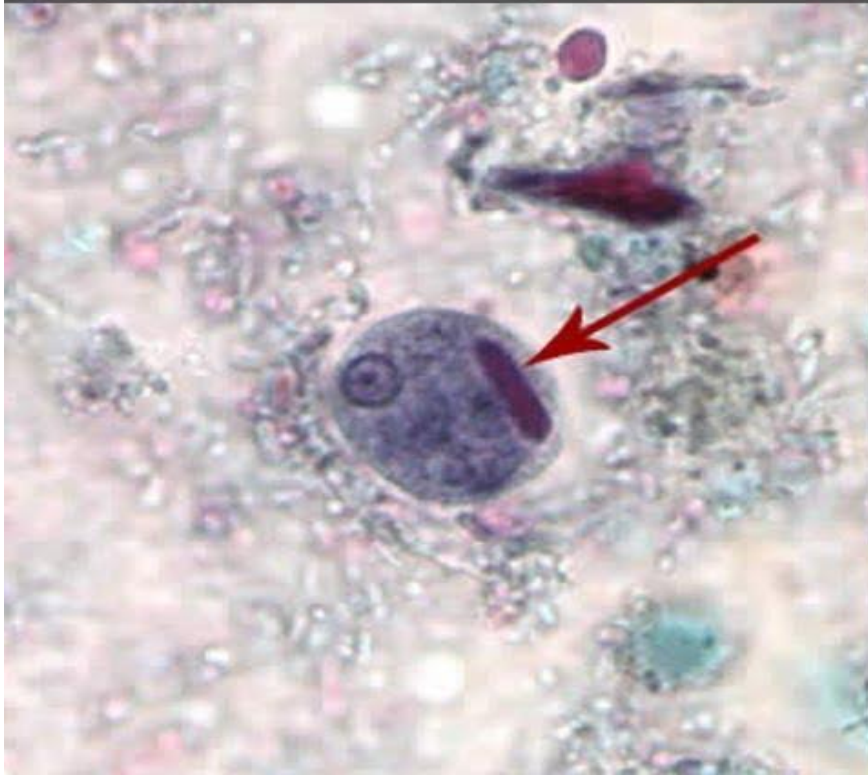
Trichuris trichiura

Trichomonas vaginalis
(трофозоит, окрашивание по Giemsa, 1000х)

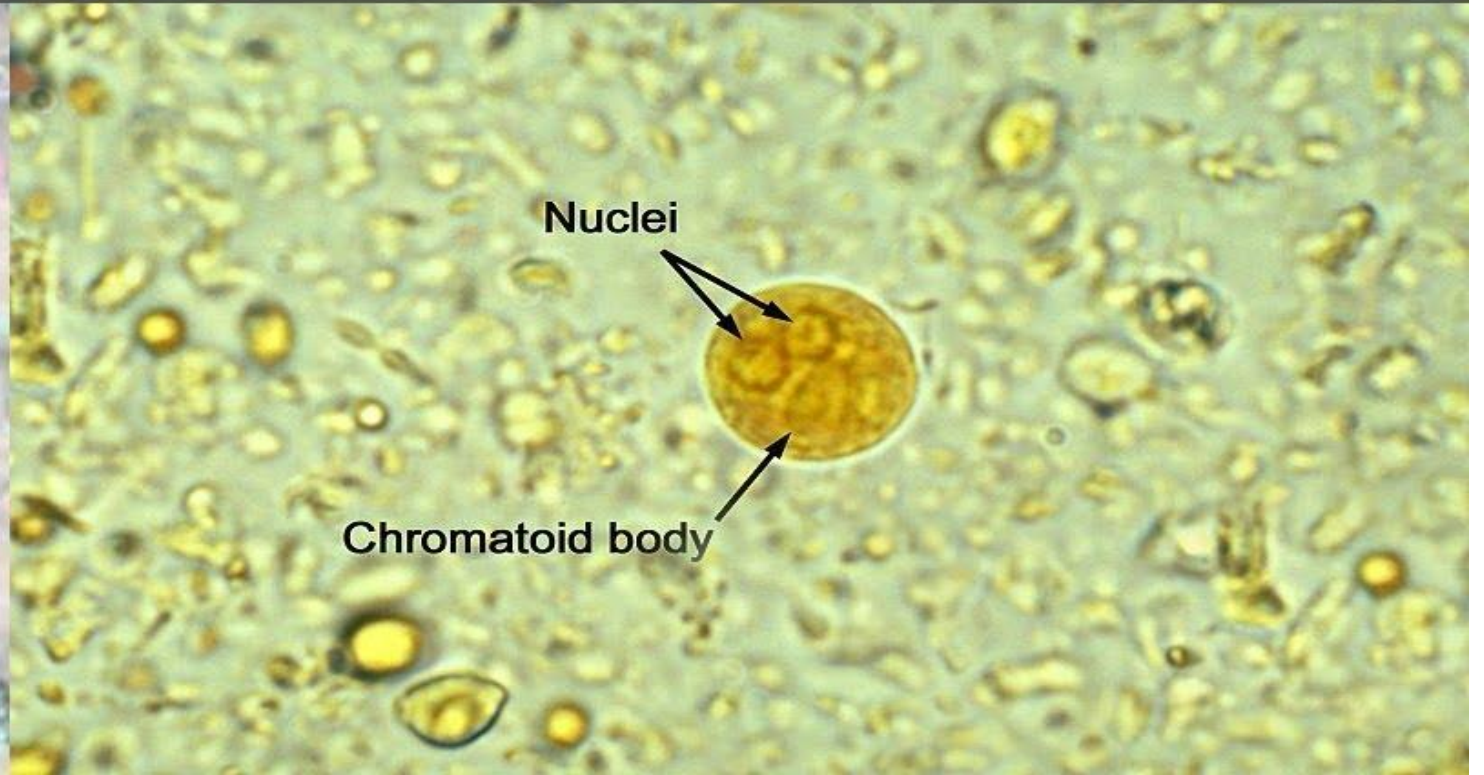


Entamoeba Histolytica

Cyst Morphology



Трихром окрашивание



Раствор Люголя

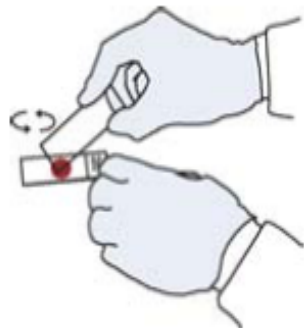
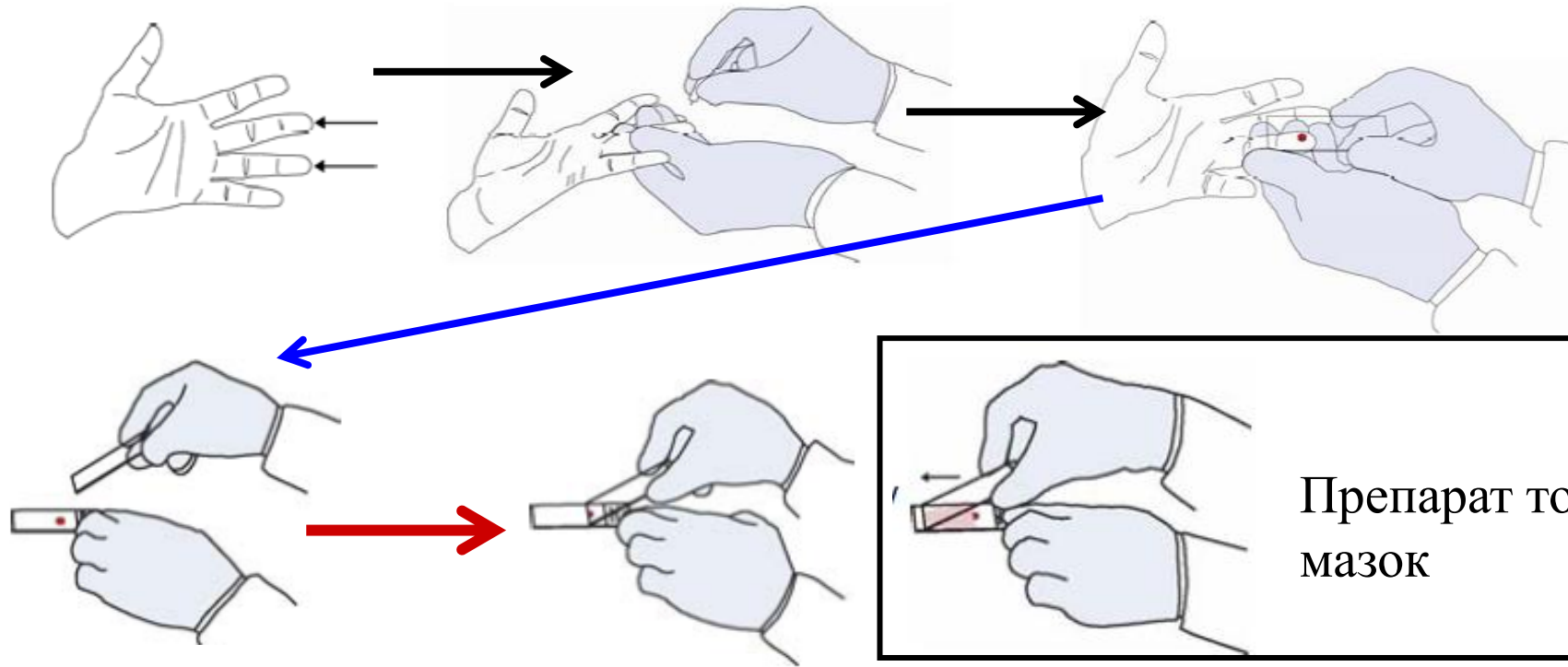
КОНЦЕНТРАЦИОННЫЙ МЕТОД:

- При малом количестве паразита используются флотационный и седиментационный методы обогащения.

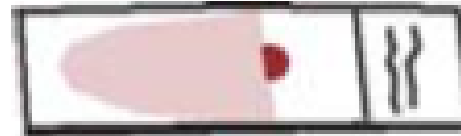
Флотация (раствор с высоким удельным весом):

- насыщенный NaCl (*Ascaris lumbricoides*)
- сульфат цинка (*цисты и нематоды*)
- седиментация (раствор с низким удельным весом):
- эфир формалина

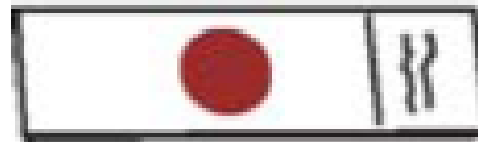
Приготовление препарата крови для микроскопии



«Толстая капля»



Тонкий мазок



«Толстая капля»

Микроскопия крови

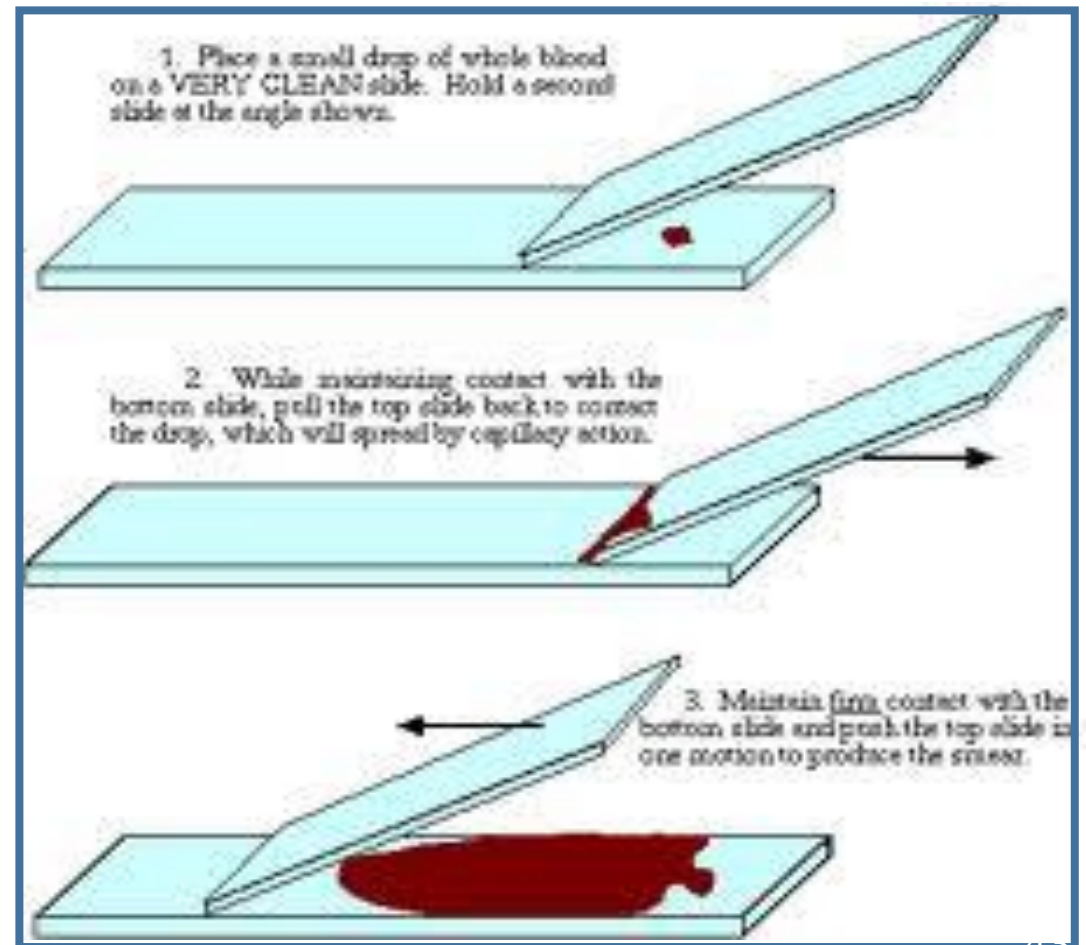
«Толстая капля»

Нахождение паразита



«Тонкий мазок»

- Идентификация вида



ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД:

- *Используется для детекции Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Toxoplasma gondii, Leishmania spp., Trypanosoma cruzi, Acanthamoeba spp.*
- *T.vaginalis* можно культивировать при анаэробных условиях при 35-37° С и 5.5-6. рН в жидкой питательной среде (Diamond, Trichocell).

БИОЛОГИЧЕСКИЙ (КСЕНОДИАГНОСТИКА):

- Не используется рутинно.
- Изучение жизненного цикла паразита в организме насекомого-вектора.
- Введение в перитонеальную полость подопытного животного метацестод *Echinococcus multilocularis*, полученных хирургической резекцией

Ксенодиагноз:

- Trypanosomes (заражают мышей, крыс)
- Toxoplasma (заражают все виды лабораторных животных)



При болезни **Чagas** (trypanosome) вектор заражают экспериментальным путем .

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД: (ИММУНОДИАГНОСТИКА – ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНА В КАЛЕ):

- ИФА тесты – определение антигена *E.histolytica*.
- В данных тестах используются моноклональные антитела к адгезивному протеину *E.histolytica*
- *E.histolytica* / *E.dispar* (непатогенная амеба) – есть много ИФА тестов для дифференцировки данных амеб. Только TechLab тест обладает специфичностью к *E.histolytica*.
- *Комбинированные тесты Cryptosporidium, Giardia и E.histolytica*.
- ИФР – определение паразита в патологическом материале при помощи моноклональных антител, помеченных флюоресцирующим изотиоцианатом.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД:

(ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ):

- ИФА
- ИФР
- РФК
- ГА

- ✓ Амебиаз
- ✓ Лейшманиоз
- ✓ Малярия
- ✓ Токсоплазмоз
- ✓ Трихиноз
- ✓ Филяриаз
- ✓ Эхинококкоз

- Кожно-аллергические пробы
- ✓ *Leishman test*(проба Montenegro)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

- При невозможности идентификации другими тестами можно использовать молекулярно-генетический метод:
 - полимеразная цепная реакция(ПЦР)
 - рестрикционный анализ
 - секвенирование