

Федеральное государственное бюджетное образовательного учреждения
образования «Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В. Ф. Войно-Ясинецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фармацевтический колледж

КУРСОВАЯ РАБОТА

Тема: Общая характеристика и лабораторная диагностика
возбудителя сифилиса
по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика
ПМ 04. Проведение лабораторных микробиологических исследований
МДК 04.01 Теория и практика лабораторных микробиологических
исследований

Выполнил: Фортунянова Ю.А., Кичеева К.А. _____
подпись, дата

Руководитель: Тюльпанова О.Ю. _____
подпись, дата

Работа оценена: _____
(оценка, подпись преподавателя)

Красноярск, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИФИЛИСА.....	4
1.1. Морфология.....	4
1.2. Культивирование	4
1.3. Антигенная структура.....	5
1.4. Резистентность	6
1.5. Патогенез	6
1.6. Иммунитет	7
1.7. Профилактика	8
ГЛАВА 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА	10
2.1. Микробиологическая диагностика	10
2.2. Серологическая диагностика.....	13
2.3. Лечение сифилиса.....	17
ВЫВОДЫ	18
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	19

ВВЕДЕНИЕ

Сифилис является социально значимым венерологическим заболеванием. Неблагоприятные последствия данного заболевания заключаются в значительном увеличении числа лиц, страдающих бесплодием.

В ряде районов Красноярского края показатель заболеваемости сифилисом превышает среднекраевой уровень: Дзержинский район (51,0 случаев на 100 тыс. человек населения), Ирбейский район (43,7 случаев на 100 тыс. человек населения), Иланский район (49,0 случаев на 100 тыс. человек населения), Канский район (43,4 случаев на 100 тыс. человек населения), Таймырский (Долгано-Ненецкий) муниципальный район (33,0 случаев на 100 тыс. человек населения), город Красноярск (36,4 случаев на 100 тыс. человек населения). [6]

Цель исследования: изучение общей характеристики и лабораторной диагностики возбудителя сифилиса.

Задачи:

1. Изучить общую характеристику возбудителя сифилиса.
2. Изучить современные методы лабораторной диагностики сифилиса.
3. Изучить статистику заболеваемости сифилисом по Красноярскому краю.

ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИФИЛИСА

Сифилис - хроническое венерическое заболевание, вызываемое бледной трепонемой, имеющее рецидивирующее течение с характерной периодизацией клинических симптомов, способное поражать все органы и системы, передающееся преимущественно половым путем.

Возбудитель - бледная трепонема (*Treponema pallidum*), принадлежащая к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaceae*, роду *Treponema* - был открыт в 1905 г. Ф. Шаудином и Э. Гофманом. Они обнаружили ее у больных сифилисом в морфологических элементах кожной сыпи и лимфатических узлах. В 1912 г. Noguchi и Moore выявили ее в коре головного мозга у больных с прогрессивным параличом. [1]

1.1. Морфология

Бледная трепонема имеет спиралевидную форму с завитками (8–12), грамотрицательный анаэроб. Длина микроорганизма — 6–12 мкм, ширина — 0,1–2,0 мкм. Бледной трепонеме свойственны четыре характерных движения: вращательное вокруг продольной оси, поступательное, сгибательно разгибательное (маятникообразное) и контрактильное (волнообразное, сократительное), что наряду с числом и формой завитков является ее дифференциальным (от других трепонем) признаком.

1.2. Культивирование

Бледные трепонемы очень требовательны к питательным средам. На искусственных питательных средах они растут только в присутствии кусочков мозга или почек кролика и асцитической жидкости. Растут медленно, 5-12 дней при температуре 35-36°C в анаэробных условиях. Бледные трепонемы хорошо размножаются в курином эмбрионе.



Рисунок 1. *Treponema pallidum*.

Окраска по Романовскому-Гимзе.

Treponema pallidum является грамотрицательным микроорганизмом. Однако, по Грамму не окрашивается, так как имеет в своём составе гидрофобные частицы, не восприимчивые к анилиновым красителям.

При окраске по Романовскому-Гимзе приобретает слабо – розовый цвет. Эта особенность послужила основанием для видового названия возбудителя сифилиса. [2]

1.3. Антигенная структура

T. pallidum имеет мало изученную антигенную структуру. Она представлена специфическим термолабильным протеиновым антигеном, неспецифическим липоидным антигеном, а также антигеном полисахаридной природы.

Антигены бледной трепонемы – это преимущественно белки, липиды и полисахариды наружной мембраны клетки.

Важную роль играет липополисахарид (ЛПС) клеточной стенки бактерии. Он выполняет антигенную и токсическую функции, являясь эндотоксином бледной трепонемы.

Липоидный антиген сходен с тканевым экстрактом бычьего сердца – кардиолипином.

1.4. Резистентность

Устойчивость к факторам окружающей среды. Бледные трепонемы малоустойчивы, температура 45-55°C губит их через 15 мин. К низким температурам устойчивы. При замораживании сохраняются до года. Спирохеты чувствительны к солям тяжелых металлов (ртути, висмута, мышьяка и др.). Обычные концентрации дезинфицирующих веществ губят их в течение нескольких минут. Они чувствительны к бензилпенициллину, бициллину и др. Под влиянием некоторых факторов внешней среды и антибактериальных препаратов трепонемы могут образовывать цисты. В такой форме длительно находятся в организме в латентном состоянии. Патогенные штаммы бледной трепонемы хранят в бескислородной среде при температуре от - 20 до - 70°C или высушенными из замороженного состояния. Цисты и L-формы являются формами устойчивого выживания в неблагоприятных условиях среды. [2]

1.5. Патогенез

К факторам вирулентности бледной трепонемы относят белки наружной мембраны и ЛПС, проявляющие токсические свойства после освобождения из клетки. Возбудитель проникает через входные ворота - микротравмы слизистых оболочек (половых путей, рта, прямой кишки) или кожных покровов, мигрирует через лимфатическую и кровеносную системы. Патогистологические исследования показали, что в первые дни после заражения бледные трепонемы заполняют лимфатические щели и периваскулярные лимфатические пространства. Лишь после этого они обнаруживаются в просветах мелких кровеносных сосудов и их стенках. Объяснение такого тропизма бледной трепонемы, являющейся факультативным анаэробом, видят в значительно меньшем содержании кислорода в лимфе по сравнению с артериальной и венозной кровью. Проникшие в организм бледные трепонемы интенсивно размножаются и распространяются в лимфе, где содержание кислорода не превышает 0,1%, в

то время как в венозной крови оно в 100, а в артериальной - в 200 раз выше (8 - 12 и 20% соответственно).

Наряду с продвижением по лимфатическим сосудам трепонемы разносятся по всем органам и тканям. Подтверждением того служат известные случаи заражения реципиентов кровью доноров, находящиеся в инкубационном периоде болезни.

В патогенезе различают три стадии. При первичном сифилисе наблюдается образование первичного очага - твердого шанкра в месте входных ворот инфекции, с последующим проникновением в региональные лимфоузлы, где возбудитель размножается и накапливается. Первичный сифилис продолжается 6 недель.

Вторая стадия характеризуется генерализацией инфекции, сопровождающейся проникновением и циркуляцией возбудителя в крови, что сопровождается кожными высыпаниями. Продолжительность вторичного сифилиса у нелеченных больных колеблется в пределах 1-2 лет.

В третьей стадии обнаруживаются инфекционные гранулемы (гуммы, склонные к распаду), локализующихся во внутренних органах и тканях. Данный период у нелеченных больных продолжается несколько лет и заканчивается поражением ЦНС (прогрессивный паралич) либо спинного мозга (спинная сухотка). [3]

1.6. Иммунитет

Иммунитет при сифилисе имеет место гуморальный и клеточный иммунный ответ. Образующиеся антитела не обладают протективными свойствами. Клеточный иммунный ответ связан с фиксацией возбудителя и образованием гранулем. Однако элиминации возбудителя из организма не происходит. Вместе с тем неблагоприятные условия среды индуцируют образование трепонемами цист, которые локализуются в стенке кровеносных сосудов. Наряду с цистами трепонемы образуют L-формы.

1.7. Профилактика

Комплекс профилактических мероприятий при сифилисе включает в себя лечебно-диагностические, диспансерные, противоэпидемические, юридические, в том числе и законодательные мероприятия. Учитывая социальную значимость сифилиса, его профилактика должна быть общественной и личной.

Общественная профилактика сифилиса предусматривает:

- обязательный учет больных сифилисом и другими инфекциями, передаваемыми половым путем;
- обязательное привлечение к лечению больных манифестными и скрытыми формами сифилиса в течение первых суток с момента установления диагноза; амбулаторное лечение проводится социально-адаптированным лицам;
- обследование всех лиц, находившихся в половом и тесном бытовом контакте с заболевшими сифилисом;
- регулярное проведение профилактических осмотров работников детских учреждений, пищевых объектов, автопредприятий;
- активное выявление больных сифилисом среди групп риска;
- обязательное обследование всех доноров с исследованием крови на серологические реакции;
- серологическое обследование на сифилис всех взрослых больных, находящихся на обследовании и лечении в общесоматических стационарах;
- применение единых методов диагностики и схем терапии больных сифилисом и при показаниях - контактных с больными лиц;
- принудительное освидетельствование и лечение лиц, которым такие меры показаны, но они уклоняются от добровольного их применения;
- контрольное наблюдение за пациентами после окончания лечения до снятия их с учета;
- сохранение врачебной тайны;

- проведение мероприятий по повышению квалификации медицинского персонала ЛПУ дерматовенерологического профиля по вопросам клиники, диагностики и профилактики инфекций, передаваемых половым путем;
- пропаганда санитарно-гигиенических знаний по профилактике венерических заболеваний;
- участие в борьбе с распространением инфекций, передаваемых половым путем, других заинтересованных ведомств и организаций.

Индивидуальная профилактика осуществляется как в пунктах профилактики, так и самостоятельно лицом, имевшим случайную половую связь и таким образом подвергшимся опасности заражения сифилисом или другой болезнью, передаваемой половым путем. Аутопрофилактика проводится с помощью индивидуальных (карманных) профилактических средств в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. К таким средствам относятся хлоргексидин биглюконат (гибитан), цидипол, мирамистин. Профилактика в значительной степени обеспечивается использованием барьерных методов контрацепции - презервативов.

ГЛАВА 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Основные методы лабораторной диагностики - микроскопический и серологический. В ранний период болезни материалом для лабораторной диагностики служит выделение из твердого шанкра, пунктат с лимфатических узлов, соскобы с розеол, сифилид подобное. При вторичном и третичном периодах исследуют сыворотку крови и ликвор. В связи с тем, что выделение чистых культур трепонем в обычных бактериологических лабораториях невозможно, во время первичного периода болезни (редко позже) проводят микроскопический (бактериоскопический) метод диагностики. Начиная с вторичного периода, используют, в основном, серологические методы.

2.1. Микробиологическая диагностика

Наряду с серологической диагностикой методика обнаружения бледных трепонем (микробиологическая диагностика) играет важную роль, особенно в период серонегативного сифилиса, когда еще в крови отсутствуют антитела, но уже есть первые проявления свежего первичного сифилиса (твердый шанкр).

Биологическим материалом для исследования служит отделяемое с поверхности твердых язв (шанкров), содержимое пустулезных сифилидов, мокнущих и эрозивных папул, пунктаты инфицированных лимфатических узлов, ликвор и амниотическая жидкость, для проведения ПЦР — кровь. Чувствительность данного метода исследования зависит от наличия в биологическом материале бледных трепонем и достигает 98,6%. Специфичность данного теста во многом зависит от правильного выбора мишени для амплификации при проведении диагностики и достигает 100%.

Вместе с тем, в связи с недостаточно изученной сравнительной характеристики чувствительности и специфичности прямых методов диагностики сифилиса и ПЦР, данный метод обследования в РФ для диагностики заболевания пока не разрешен.

ПЦР на сифилис разрешено проводить лишь в некоторых случаях, как дополнительный метод диагностики врожденного сифилиса, нейросифилиса, при затруднениях проведения диагностики сифилиса с использованием серологических методов исследования у ВИЧ-больных. Выявление ДНК бледной трепонемы с применением ПЦР говорит либо о наличии жизнеспособных бактерий, либо об остатках погибших, но содержащих способных к образованию дополнительных копий отдельных участков хромосомной ДНК.

Наилучшей методикой обнаружения возбудителей сифилиса является исследование биологического материала в темном поле микроскопа. Данная методика позволяет увидеть бледные трепонемы в живом состоянии изучить ее особенности строения и движения, отличить патогенные возбудители от сапрофитов.

Методика исследования *T. pallidum* в «тёмном поле»

Популярным методом диагностики является обнаружение бледной трепонемы в тёмном поле микроскопа. Этот метод позволяет наблюдать за трепонемой, учитывать особенности её морфологии и движения.

Материал для исследования забирают с твердого шанкра или с эрозий гранулём и папул. Осторожно захватывают предварительно очищенный материал петлей, смешивают с каплей физиологического раствора и наносят на предметное стекло.

Живой материал изучают в тёмном поле микроскопа. Для микроскопии используют специальный темнопольный конденсор соответствующего оптического разрешения.

Методика окраски по Романовскому - Гимзе

При окраске препаратов по методу Романовского - Гимзе бледная трепонема приобретает розовый или розовато-фиолетовый цвет, в то время как другие трепонемы окрашиваются в синий цвет. [3]

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР, разработанная в 1991 году для обнаружения молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) бледной трепонемы, является высокочувствительным и специфичным, позволяет выявить фрагменты ДНК возбудителя.

Базируется данный анализ на копировании коротких участков ДНК бледной спирохеты, который удовлетворяет заданным параметрам и присутствует в образце. Всё это выполняется в искусственных условиях (*in vitro*). Реакция проводится в приборе - амплификаторе, который обеспечивает периодизацию температурных циклов. Происходит охлаждение с последующим нагреванием пробирок с погрешностью в $0,1^{\circ}\text{C}$.

ДНК-матрицу прогревают в течение 2 минут при температуре $92-98^{\circ}\text{C}$ (максимальная температура используется, если полимераз термостабильна). При нагревании цепи ДНК расходятся из-за распада водородных связей между ними. В стадии отжига температуру реакции снижают для связывания праймера с одноцепочечной матрицей.

Отжиг занимает около 30 секунд, в течение этого времени синтезируются сотни нуклеотидов. Вновь синтезируемые молекулы копируются полимеразой, в результате многократно увеличиваются специфические фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты. Последующая детекция фрагментов проводится с помощью электрофореза в геле агар.

ПЦР-диагностика сифилиса пока носит экспериментальный характер, но оправдана при выявлении врождённой инфекции, в сложных диагностических случаях или при минимальном содержании бледных трепонем в исследуемом материале. [6]

2.2. Серологическая диагностика

Для выявления сифилиса используются нетрепонемные тесты или комплекс серологических реакций (КСР). Серологическая диагностика применяется с 5-й недели от момента заражения или с 2-3 недели после появления твердого шанкра. Антитела выявляются практически у всех больных со свежим первичным, вторичным и рецидивным сифилисом. Серологические реакции положительные у 70 — 80% больных с третичным активным сифилисом, в 50 — 60% случаев у больных третичным скрытым сифилисом. Серологические реакции с применением нетрепонемных тестов могут давать ложноположительные результаты.

Нетрепонемные тесты

Реакция микропреципитации (РМП)

Микрореакция преципитации применяется для массовых обследований отдельных групп населения, диагностики сифилиса и контроля над эффективностью лечения. Для проведения данного вида исследования необходимо небольшого количества исследуемого материала. В основе микрореакции преципитации лежит иммунологическая реакция антиген-антитело. В случае наличия антител в сыворотке крови обследуемого комплекс антиген-антитело выпадает в осадок с образованием хлопьев. Реакция проводится в лунках специальной стеклянной пластины. Оценивается по интенсивности выпавшего осадка и величине хлопьев. Это качественная проба. При количественной оценке используются 10 разведений сыворотки, помещаемой в 10 лунок с соответствующей маркировкой. При качественной РМР ответ указывается в виде крестов (плюсов) или минуса, при количественной указывается титр антител. При обследовании беременных, доноров и для контроля эффективности лечения не применяется. VDRL и RPR являются разновидностями микрореакций.

VDRL

Рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения метод постановки реакции с антигеном липоидной природы (АГ) по праву считается лучшим среди других стандартных нетрепонемных тестов. Разработан в США, штате Джорджия в лаборатории венерических болезней.

Аббревиатура учреждения послужила названием для пробы – VDRL. VDRL - это модификация МР. Сыворотку от больного сифилисом инактивируют и помещают на предметное стекло. Используемый антиген состоит из кардиолипина, холестерина и лецитина в разном процентном соотношении. Ответ регистрируется практически сразу. Отчётливая флоккуляция возникает в присутствии в сыворотке антител. Для оценки количества антител, сыворотку предварительно разводят в геометрической прогрессии.

Преимущества VDRL: сравнительно высокая чувствительность и специфичность, легкость выполнения, малая стоимость реактивов, получение быстрого ответа. Недостатком VDRL является относительно высокая частота ложноположительных результатов. [6]

Трепонемные тесты

Трепонемные тесты исполняются со специфическими антигенами *Treponema pallidum*, которые необходимы для установления окончательного диагноза. Это реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакции непрямой гемагглютинации (РПГА), иммуноферментный анализ (ИФА) и др. После положительного результата нетрепонемного теста (RPR, МР, VDRL) всегда должны выполняться трепонемные (РПГА, ИФА, РИФ). Трепонемные тесты более сложны в исполнении, чем экспресс-тесты, и требуют больших затрат денежных средств. Трепонемные тесты остаются положительными многие годы после излечения сифилиса.

Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA)

Данный метод диагностики автоматизирован. С помощью ИФА определяются иммуноглобулины класса М и G. Методика IgM – ИФА может быть использована в качестве скринингового и подтверждающего теста. Чувствительность ИФА и его специфичность аналогичны РИФ. При сифилисе ИФА дает положительные результаты с третьего месяца инфицирования и довольно долго (иногда всю жизнь) остается положительным.

Идентификация полученного комплекса осуществляется на этапе ферментации с помощью иммунной сыворотки, меченной ферментом. При химической реакции фермент окрашивает полученные комплексы. Интенсивность окрашивания зависит от количества специфических антител в крови пациента и фиксируется спектрофотометром.

Чувствительность ИФА составляет более 95%. Метод используется в автоматизированном режиме для исследования декретируемых групп населения: доноров, беременных и других, для уточнения диагноза при положительных и ложноположительных нетрепонемных тестах.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

Занимает срединное положение из всех специфических методов серодиагностики. Реакция основана на принципах идентификации методом люминесцентной микроскопии флюоресцирующего комплекса, связанного с иммуноглобулином организма человека на поверхности клетки-патогена.

Флюоресцирующий комплекс состоит из человеческого глобулина и флюоресцеин тиоизоционата. Существует несколько модификаций этой реакции:

1. Реакция иммунофлюоресценции с адсорбцией;
2. Реакция IgM – РИФ с адсорбцией.
3. Реакция иммобилизации *Treponema pallidum* (РИБТ)

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)

РПГА основана на способности эритроцитов, на которых адсорбированы антигены бледной трепонемы, в присутствии сыворотки больного склеиваться (гемагглютинация). РПГА применяется для диагностики всех форм сифилиса, в том числе скрытого. При применении высокого качества антигена данный вид серологической реакции превышает все остальные тесты по специфичности и чувствительности.

Принцип реакции основан на агглютинации эритроцитов, несущих на своей поверхности антигены бледной трепонемы, если к ним добавить специфические антитела. Результат РПГА будет положительным уже в конце инкубационного периода, т. е. через 3-4 недели. [4]

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг – высокочувствительный метод, модификация простого ИФА. Реакция основана на электрофорезе с разделением антигенов бледных трепонем. Разделенные иммунодетерминанты переносят на нитроцеллюлозную бумагу и проявляют в ИФА. Далее инкубируют сыворотку и смывают не связавшиеся антитела. Полученный материал обрабатывают иммуноглобулинами (IgM или IgG), мечеными ферментом.

Проблема оптимизации лабораторной диагностики сифилиса не потеряла свою актуальность до настоящего времени. Современные методы диагностики, несмотря на стремление учёных привести диагностику к максимально высоким показателям чувствительности и специфичности, требуют контрольной проверки и индивидуального подхода.

На фоне экономико-технического развития медицины наблюдается и прогресс в разработке новых критериев диагностики сифилиса. Всё это позволит быстро, успешно и безошибочно лечить пациентов.

2.3. Лечение сифилиса

Сегодня главным методом противосифилитической терапии является длительное систематическое назначение препаратов пенициллинового ряда. Терапия назначается только после подтверждения наличия болезни. Продолжительность лечения напрямую зависит от формы болезни и физического состояния больного. Если лечебные мероприятия начались на ранних стадиях и проводятся по современным методикам с использованием, так называемых трепонемотцидных антибиотиков. На ранних стадиях болезнь полностью излечима, а ее терапию проводит врач-дерматолог. Чем позже будет поставлен диагноз, тем труднее лечить заболевание. Наиболее распространенным методом лечения является введение больному антибиотиков. Они позволяют исключить из тела спирохеты и защитить органы от повреждений.

При сифилисе рекомендуется пенициллин, схема введения которого – 1 200 000 ЕД внутримышечно в течение 20-ти дней (однократная суточная доза). Курс лечения латентной фазы и вторичного сифилиса составляет 30 дней.

При аллергии на пенициллин врач может назначить следующие препараты: «Тетрациклин», «Доксицилин», «Цефтриаксон», «Эритромицин».

ВЫВОДЫ

1. Изучен возбудитель сифилиса - бледная трепонема, спиралевидный организм, малоустойчив вне человеческого организма, гибнет при высоких температурах, передается преимущественно половым путем. Инфицирование проявляется в виде твердого шанкра, розеол, язв. Профилактикой является избегание беспорядочной половой связи, использование средств индивидуальной защиты и личной гигиены.
2. Изучены современные лабораторные методы, их чувствительность, преимущества и недостатки. Методом, применяемым для массового обследования, является РМП, а самым чувствительным и специфическим методов считается РИФ и иммуноблоттинг-100%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Зверев В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 2, 2010.
2. Л.Б. Борисов. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология — 5-е изд., испр. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2016. — 792 с.: ил.
3. Марданлы С.Г., Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика сифилиса — Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011 — 24 с.
4. Родионов А.Н. Сифилис — 3-е изд., СПб.: ООО "Питер", 2007. - 315 стр.
5. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Акимов В.Г. Кожные и венерические болезни: учебник. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
6. Лабораторные методы диагностики сифилиса URL: <http://microbak.ru/infekcionnye-zabolevaniya/sifilis/diagnostika-sif.html> [Электронный ресурс] (Дата обращения 12.03.2018)
7. Государственный доклад о состоянии здоровья населения Красноярского края в 2015 году.