

Лабораторная диагностика малярии

Основывается на данных:

- Эпидемиологического и географического анамнеза;
- Клинических проявлений болезни;

клинический диагноз,
предположительный

- Результатов лабораторного исследования;

окончательный диагноз видовой формы

Лабораторная диагностика

2 метода:

1. Паразитологический. Ведущий метод окрашенных препаратов крови по Романовскому - Гимза, тонкого мазка и толстой капли. Обнаружение бесполой и половой форм возбудителя при микроскопическом исследовании крови, что возможно только в период его развития в эритроците. Оба метода, имеют свои преимущества и недостатки, являются взаимодополняющими.

2. Иммунологический.

Подтверждением служит обнаружение в препарате крови любых стадий паразитов, развивающихся в эритроцитах:

- Трофозоитов (молодых/взрослых);
- Шизонтов (незрелых/зрелых);
- Половых форм;
- Гаметоцитов (мужских/женских).

внеэритроцитарные стадии:

- Мерозоиты (существуют в плазме крови короткое время, в препарате обнаруживаются редко).

Микроскопия

1. Подготовка предметных стекол;
2. Приготовление препаратов, их окраска;
3. Собственно микроскопия.

1. Подготовка предметных стекол

В настоящее время выпускают специальные стекла не требующие предварительной обработки.

Предметные стекла, не бывшие в употреблении:

- Моют в мыльном растворе
- Помещают в сосуд с водопроводной водой, меняя 6-7 раз
- Вытирают х/б тканью
- Помещают в смесь Никифорова (спирт-эфирная смесь, из расчета 1 мл на 1 стекло), до употребления. Либо, извлечь стекла через сутки, высушить х/б тканью и завернуть в чистую бумагу.

Предметные стекла, бывшие в употреблении:

- Иммерсионное масло удаляют эфиром
- Заливают мыльным раствором, отмывая тряпочкой

Важно!

Во время манипуляций с предметными стеклами их нужно брать так, чтобы не касаться пальцами поверхности стекла.

2. Приготовление препаратов крови

Кровь берется с соблюдением правил асептики из 2-4 пальца левой руки. Кожу протирают 70° этиловым спиртом, первую выступившую каплю крови вытирают сухой ватой, удаляя остатки спирта, которые могут способствовать фиксации крови в препарате.

Важно!

Кожа в месте прокола должна быть максимально чистой, т.к. попавшие в препарат МО могут быть причиной диагностических ошибок.

Тонкий мазок

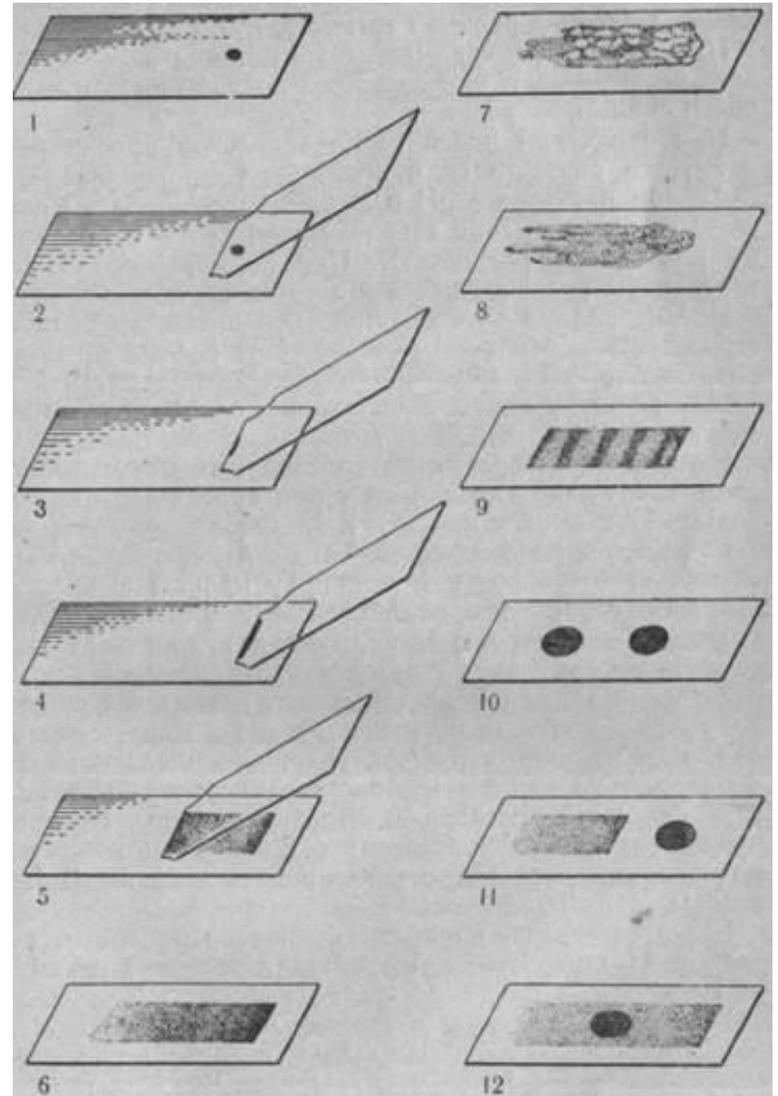
- Не должен доходить ни до конца, ни до краев предметного стекла, на котором он делается
- Диаметр капли не более 2-3 мм
- Предметное шлифованное стекло, которым делается мазок, должно быть уже стекла, на которое наносят мазок, угол последнего 45°
- Маркировка (ф.и., дата взятия)
- Фиксация в 96° этиловом спирте (20-30 мин)
- Окрашивание

Толстая капля

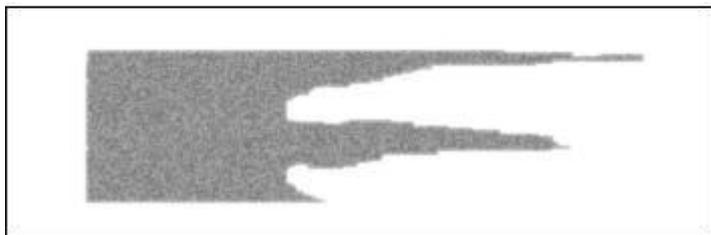
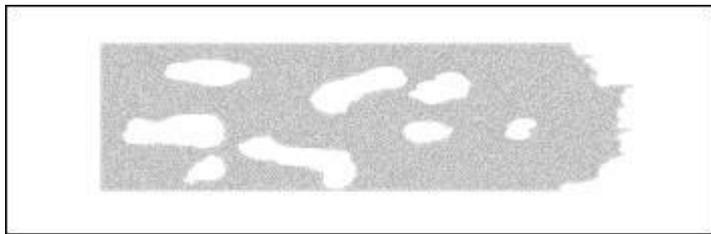
- На предметное стекло наносят каплю крови диаметром 5-10 мм, следят, чтобы в кровь не попал спирт, так как она может зафиксироваться и при последующем окрашивании препарата не произойдет нужного гемолиза.
- Каплю крови размазывают иглой или углом предметного стекла в кружок или квадрат. Либо сначала готовят мазок толще обычного, пока он не высох, на него наносят две капли, которые по влажному мазку растекаются.
- Высыхание
- Маркировка при помощи дополнительной полоски крови
- Окрашивание

2. Приготовление тонкого мазка и толстой капли

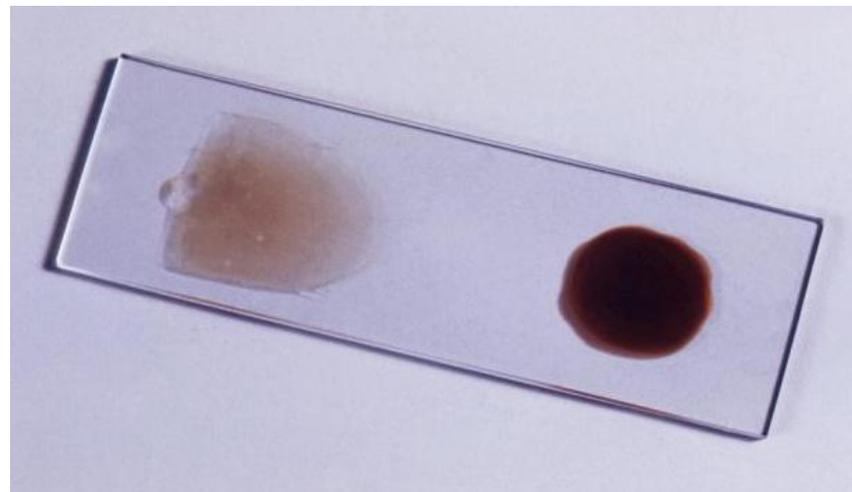
- **1—6—** этапы приготовления тонкого мазка;
- **7, 8, 9** — неправильно приготовленные мазки;
- **10—12** — разные способы приготовления толстой капли.



Дефекты тонкого мазка



Толстая капля



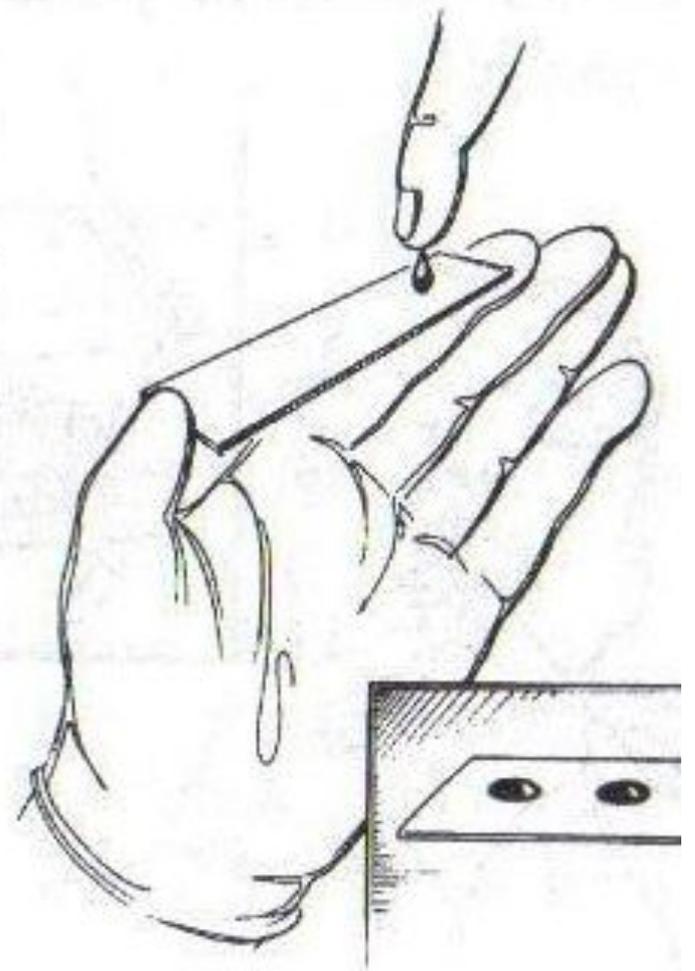
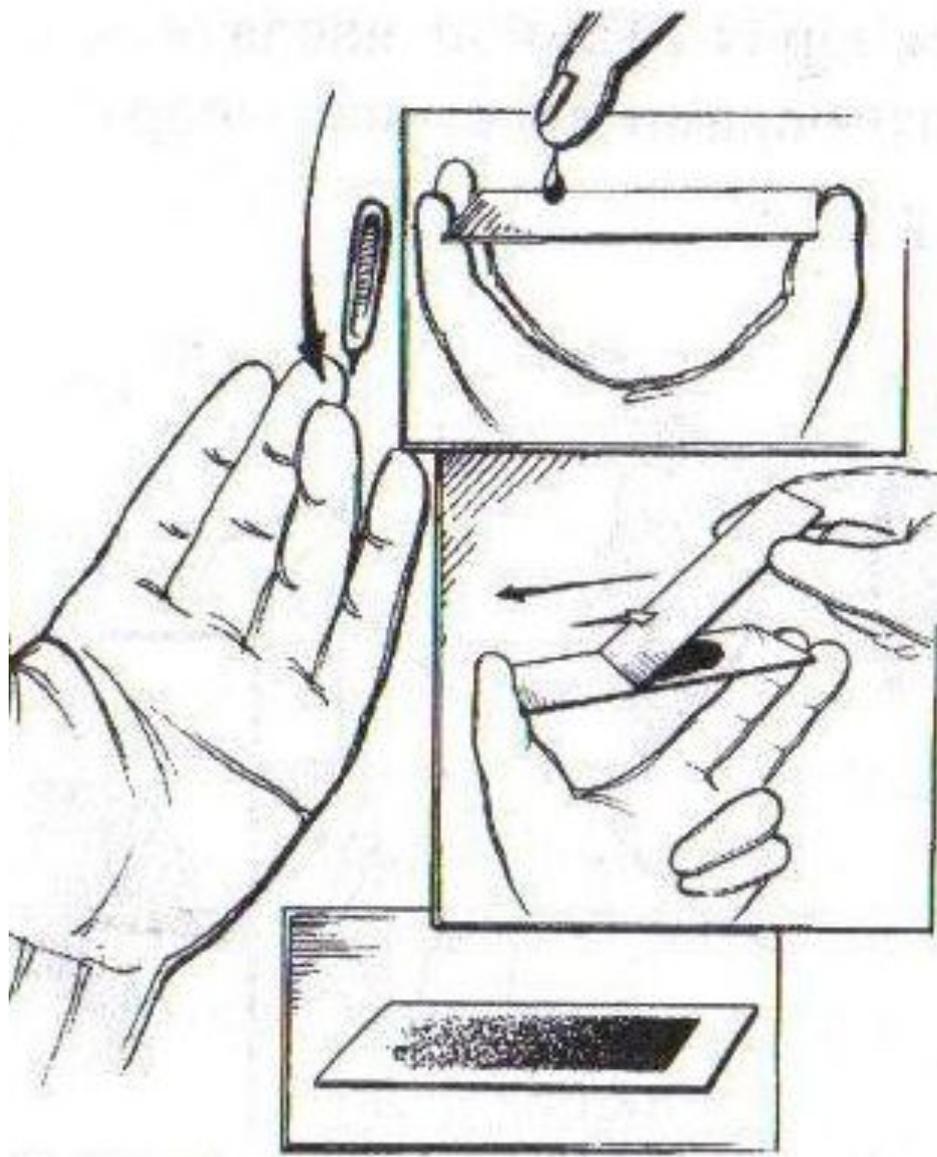
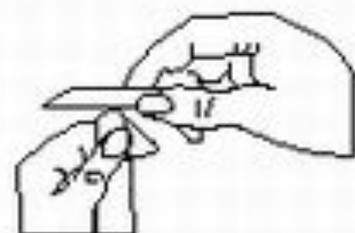


Рис. А-2. Приготовление “толстой капли” и “тонкого мазка” на одном предметном стекле



1
Взять каплю крови
на чистую
поверхность стекла



4
Приложить стекло
с каплей крови к
первому стеклу
под углом 45



2
Распространить каплю,
получив круглый мазок
диаметром 1 см



5
Одним движением
распространить
каплю крови по
первому стеклу



3
Взять новую каплю
на край другого
стекла



6
Подождать, пока мазок
высохнет, и лишь после
приступить к
фисированию и
окрашиванию

Приготовление рабочего раствора краски

- Окрашивание азур-эозиновым красителем по Романовскому-Гимзе. Концентрация раствора по стандартной методике составляет 1-2 капли краски на 1 мл раствора, предварительно проверенной на наличие в ней азура. Под микроскопом в мазке :
 - Эритроциты имеют розовый с фиолетовым оттенком цвет
 - Лейкоциты с фиолетовыми ядрами (у гранулоцитов хорошо определяется зернистость)
 - Тромбоциты темно-розового, рубинового цвета
 - Ядра паразитов окрашены примерно в тот же цвет, что и тромбоциты
- Продолжительность окрашивания толстых капель 15-30 мин., мазков – 40-45 мин. После препарат промывают слабой струей воды и высушивают на воздухе.

Важно!

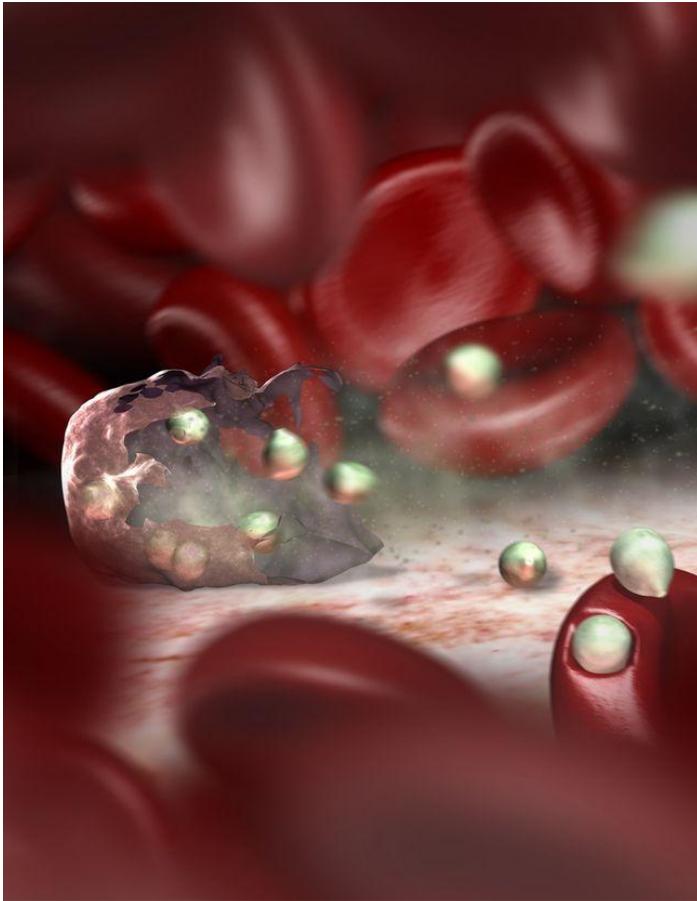
В качестве растворителя краски используют буферный раствор pH=7,0 - 7,2.

Толстую каплю не фиксируют, эритроциты должны отсутствовать (кроме остатков незрелых и пораженных паразитами)

Дефекты приготовления и окраски препаратов крови. Способы их устранения

Дефекты	Описание дефекта, причины	Способ устранения
Окрашенный мазок и толстая капля неверно окрасились (неадекватная реакция среды)	Имеют бледно-голубой, зеленый цвет. Некачественная краска, либо раствор готовился на щелочной H_2O	Дефект устраним: препарат погружают в 96° спирт до полного обесцвечивания, затем, окрашивают качественной краской как фиксированные тонкие мазки
Отрыв толстой капли от предметного стекла	Капля слишком толстая, струя воды слишком сильная	Дефект неустраним
В препаратах обнаружены бактерии, грибы, растительные клетки	Попадание в препарат загрязненной воды или из воздуха, симулирование различных стадий развития плазмодиев	Исследование другого препарата, использовать для разведения краски чистую воду
Окраска в контейнере большой партии стекол с толстыми каплями	Малярийные паразиты с одного препарата могут случайно переместиться на другой. Вид паразита становится таким же, число ложноположительным	Повторное обследование

Пораженные паразитами эритроциты



Red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites (arrows) CDC Image

