

## ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛЯМБЛИОЗА У ДЕТЕЙ

© Осмаловская Е.А.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. Россия Медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Представлен анализ современных методов выявления лямблиоза. Обозначены основные клинические критерии направления детей для исследования на лямблиоз. Проанализированы основные диагностические ошибки, приводящие к ложноотрицательным результатам. Рассмотрены приемы, повышающие вероятность своевременной диагностики, молекулярно-иммунологические альтернативы традиционным паразитологическим методам.

**Ключевые слова:** лямблиоз, клинические критерии, диагностические ошибки, паразитологическая диагностика, иммунодиагностика, серологическая диагностика, ИФА, ПЦР, энтеротест, DIF-тест.

## LABORATORY METHODS OF GIARDIASIS DIAGNOSTIC IN CHILDREN

© *Osmalovskaya E.A.*

St. Petersburg Center for Postgraduate Education of Health Care Workers of FMBA of Russia”, St. Petersburg, Russia

**Summary.** The analysis of modern methods of detection of Giardiasis is presented. The main clinical criteria for referring children to giardiasis studies are indicated. The main diagnostic errors leading to false negative results are analyzed. Considered techniques that increase the likelihood of timely diagnosis, molecular-immunological alternatives to traditional parasitological methods.

**Key words:** giardiasis, clinical criteria, diagnostic errors, parasitological diagnostics, immunodiagnostics, serological diagnostics, ELISA, PCR, enterotest, DIF-test.

Лямблиоз у детей является актуальной проблемой в разных странах [1]. Ведущее значение в установлении диагноза принадлежит лабораторному паразитологическому исследованию [2].

Обязательному исследованию на лямблиоз подлежат следующие контингенты:

- дети, посещающие дошкольные образовательные учреждения, и школьники младших классов — один раз в год при формировании коллектива или после летнего перерыва;
- персонал дошкольных образовательных учреждений — при приеме на работу и один раз в год;
- дети и подростки — при оформлении в дошкольные и другие образовательные учреждения (организации), приюты, дома ребенка, детские дома, школы-интернаты, на санаторно-курортное лечение, в оздоровительные лагеря, в детские отделения больниц;
- дети всех возрастов, находящиеся в детских учреждениях закрытого типа и круглосуточного пребывания — при поступлении и один раз в год;
- декретированные и приравненные к ним контингенты — при поступлении на работу и периодически один раз в год (работники пищевой промышленности, общепита,

в том числе детских образовательных учреждений, ассенизаторы и др.);

- лица, общавшиеся с больным или паразитоносителем (контактные);
- стационарные больные детских и взрослых больниц — по показаниям;
- амбулаторные больные — по показаниям. Показаниями к обследованию на лямблиоз являются:
- диарея неустановленной этиологии;
- хронические заболевания желудочно-кишечного тракта;
- упорная тошнота без других клинических симптомов;
- дисбиоз кишечника;
- нейроциркуляторная дисфункция, особенно в сочетании с желудочно-кишечными нарушениями;
- гипотрофия, отставание в физическом развитии;
- угнетенное настроение, депрессия, особенно в сочетании с желудочно-кишечными нарушениями;
- дерматиты, крапивницы, экземы, нейродерматиты;
- иммунодефицитные состояния;
- рецидивирующие обструктивные бронхиты, бронхиальная астма;
- аллергические реакции неустановленной этиологии;

- стойкая эозинофилия крови;
- длительный субфебрилитет неясной этиологии [3–6].

Для первичной диагностики лямблиоза используют паразитологические и, наиболее точные, молекулярно-иммунологические методы [2].

Паразитологические методы выявляют вегетативные или цистные формы лямблий по морфологической идентификации при исследовании желчи или фекалий. В дуоденальном содержимом (желательно порция «А»), при условии немедленного исследования после забора, обнаруживают подвижные вегетативные формы лямблий. Исследование секрета двенадцатиперстной кишки, полученного с помощью трехканального зонда в условиях вакуума, более эффективно для обнаружения паразита, чем микроскопия дуоденального содержимого, полученного с помощью обычных зондов. Поскольку вегетативные формы простейших чувствительны к воздействию химических веществ, пробы следует собирать в чистую сухую посуду. Даже незначительные остатки хлорсодержащих препаратов вызывают гибель вегетативных форм простейших, что может помешать диагностике. Ввиду трудоемкости и низкой информативности метод исследования дуоденального содержимого в последнее время для диагностики лямблиоза используется редко [7]. Исследование фекалий проводят в соответствии с МУК 4.2.735–99 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов» [8]. Для выявления лямблий в фекалиях применяют копрологические исследования. Вегетативные формы лямблий обнаруживаются крайне редко, в основном в разжиженных свежевыделенных фекалиях. **Пробы фекалий исследуются разными способами:** метод нативного мазка (для обнаружения цист и трофозоитов), исследование мазка, окрашенного раствором Люголя; наиболее информативны методы механического или формалин-эфирного обогащения с последующей микроскопией (при которых трофозоиты погибают) [9–11]. Копрологическая диагностика лямблий трудна и может давать ложноотрицательные результаты.

Повышает эффективность исследования соблюдение ряда особых приемов:

- исследование на лямблиоз осуществляется до назначения и приема медикаментов (антибиотики, антациды, антидиарейные средства, и т. д.), повреждающих морфологию паразитов;
- прием слабительных и/или желчегонных препаратов за 1–2 дня до исследования (особенно у пациентов с запорами);

- для исследования используют жидкие фракции фекалий из последней порции (прилежащей к тонкой кишке), собранной из 6–7 мест методом соскоба;
- жидкий кал доставляют в лабораторию не позже, чем через 15–20 мин после дефекации, т. к. вегетативные формы погибают через 30–60 мин;
- хотя исследование плотного кала можно проводить в течение суток с момента забора материала (цисты лямблий сохраняются в нем до 10 дней и более), для повышения эффективности обычно исследуют фекалии не позднее 2–3 часов после дефекации, либо используют консерванты;
- применяют консервацию порций фекалий в стеклянной посуде с 10% формалином или мертиолатенодин-формалином MISE, поливинилалкоголем (ПВА) (консерванты Турдыева, Сафаралиева, Барроу не разрушают цисты лямблий);
- тщательно смешивают кал с консервантом до получения гомогенного содержимого (пропорции кала и консерванта — 1:3);
- используют различные методы окраски мазка фекалий — раствором Люголя или трихромом гематоксилином железа. Трихром рекомендуется использовать с ПВА-фиксированными образцами кала;
- используют метод формалин-эфирного обогащения, метод всплывания.

При отрицательном первом анализе проводят не менее 3 исследований кала в последовательные дни (с интервалом в 2–3 дня). Поскольку отрицательные периоды в выделении лямблий могут колебаться от 2–3 суток до 2–3 недель, при серьезном подозрении на лямблиоз рекомендуют проводить протозоологическое исследование кала в течение 4–5 недель с интервалом в одну неделю [4, 8–11].

Причиной диагностических ошибок может быть:

- неправильно собранный материал для исследования (твердые фракции фекалий из нижних отрезков толстой кишки);
- погрешности лабораторного исследования (не используются все методы подготовки материала, низкое качество подготовки мазка, отсутствует настойчивость при просмотре препарата);
- исследование фекалий в так называемый «немой» период, когда прекращается выделение цист лямблий (сроком на 8–14 дней). Непостоянное выделение цист с калом требует не только неоднократного исследования фекалий, но и использования других методов лабораторного исследования [4, 8,

9–11]. Улучшает результаты микроскопии новая методика — энтеротест на лямблиоз: проглатывается капсула с нейлоновой нитью внутри, в кишечнике капсула растворяется и лямблии прилипают к нити. Далее в течение 2 ч нить выходит с каловыми массами и подвергается микроскопическому исследованию [5].

Более высоким диагностическим потенциалом обладает метод обнаружения антигенов лямблий в кале и биоптатах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [12, 13]. Преимуществом ПЦР являются высокие специфичность и чувствительность (метод позволяет диагностировать лямблиоз даже в «немые» промежутки), возможность определения отдельных генов возбудителя для оценки его патогенности, отсутствие жестких требований к забору и хранению материала. Чувствительность метода 92–98% [14–17].

«Золотым стандартом» за рубежом считается прямой иммунофлуоресцентный (DIF) тест, основанный на связывании специфических флуоресцирующих моноклональных антител к *Giardia*. Метод иммунохроматографии рекомендован для диагностики лямблиоза Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ, 26 ноября 2013 г. Чувствительность метода 100% и специфичность 95,2%, что быстро позволяет получить достоверный результат [5, 18, 19].

Диагностика лямблиоза возможна и при использовании антител к цельным трофозоидам или моноспецифических антител к антигенам лямблий, выявляющих лямблии в кале и в «немые» промежутки; антигены исчезают из фекалий через 2 недели после эрадикации [20–22]. Метод ИФА является чувствительным, специфичным и полезным для скрининга большого количества образцов в течение короткого периода времени [20]; он утвержден Всемирной организацией здравоохранения в качестве точного теста для обнаружения лямблий [22] и может использоваться для анализа образцов не только кала, но и дуоденальных биоптатов и слюны. Апробированы многочисленные тест-системы, которые разрешены к применению для диагностики лямблиоза [22–27].

Серологические методы диагностики являются косвенными методами лабораторной диагностики лямблиоза, поэтому могут использоваться как дополнительные диагностические методы. Исследуется сыворотка венозной крови (забранной натощак) в соответствии с МУК 3.2.1173-02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных за-

болеваний» [24] и инструкцией, используемой диагностической тест-системы. Специфические IgM и IgG к антигенам лямблий обнаруживают в сыворотке крови с 10–14-го дня заболевания. Выявление IgM свидетельствует об остром заболевании лямблиозом, после санации они быстро исчезают. IgG сохраняются до 2 месяцев после полной элиминации паразита. Уровень IgM и IgG зависит от особенностей иммунной системы хозяина, интенсивности инвазии, формы течения заболевания и ряда других факторов. Очень часто антитела к лямблиям не обнаруживаются у детей с лимфатико-гипопластическим диатезом или при упорном, рецидивирующем лямблиозе, что свидетельствует о снижении гуморального иммунитета и является плохим прогностическим признаком. В то же время положительные результаты серологических проб на лямблиоз обнаруживаются при инвазии другими простейшими (кишечная амеба, бластоцисты), что не исключает наличие перекрестных ложноположительных реакций. Таким образом, диагностирование лямблиоза и назначение специфического лечения только на основании положительной серологической реакции, без исследования проб фекалий нельзя считать оправданным [4].

Многочисленные исследования посвящены сравнительной характеристике используемых методов [25–31]. Считается, что каждый из них не дает 100% информации. Все они, наряду с клиническими данными взаимно дополняют друг друга и должны использоваться комплексно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова В.П., Осмоловская Е.А. Современные представления об этиологии и эпидемиологии лямблиоза у детей. В сборнике: Пищевая непереносимость у детей. Современные аспекты диагностики, лечения, профилактики и диетотерапии Сборник трудов. 2018. С. 145–161.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; approved guideline. CLSI document M28-A2. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2005.
3. ВОЗ. Доклад комитета экспертов. Профилактика кишечных паразитарных инвазий и борьба с ними. Сер. техн. докл. 1988.90с.
4. Лямблиоз: учебное пособие для врачей / В.П. Новикова, Е.Ю. Калинина, А.М. Шабалов, Е.А. Осмоловская. СПб.: ИнформМед, 2010. 120 с.
5. Захарова И.Н., Авдохина Т.И., Дмитриева Ю.А., Будаева Е.К., Скоробогатова Е.В. Лямблиоз у детей. РМЖ, Педиатрия, 2013. 24:1161–1166.
6. Профилактика лямблиоза— методические указания-МУ 3–2–1882–04 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 03–03–2004).
7. Gupta, S.K., J.M. Croffie, M.D. Pfeifferkorn, J.F. Fitzgerald. Diagnostic Yield of Duodenal Aspirate for

- G. intestinalis and Comparison to Duodenal Mucosal Biopsies. *Digestive Diseases and Sciences*. 48, 3, 2003.
8. Методические указания МУК 4.2.735–99 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов» <http://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293790/4293790006.htm>.
  9. Wolfe MS: Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5:93–100, 1992.
  10. Truant A.L., Elliott S.H., Kelly M.T., Smith J.H. Comparison of Formalin-Ethyl Ether Sedimentation, Formalin-Ethyl Acetate Sedimentation, and Zinc Sulfate Flotation Techniques for Detection of Intestinal Parasites. *Journal of clinical microbiology*, 13, 5, 882–884, 1981.
  11. Zimmer J.F., Burrington D.B. Comparison of four techniques of faecal examination for detecting canine giardiasis. *J. Am. An. Hosp. Ass.*, 22, 161–167, 1986.
  12. Ghieth M.A., Kotb M.A., Abu-Sarea E.Y. El-Molecular detection of giardiasis among children at Cairo University Pediatrics Hospitals. *Badry AA. J Parasit Dis*. 2016 Dec; 40(4):1470–1474. Epub 2015. Sep 18.
  13. Ghoshal U., Shukla R., Pant P., Ghoshal U.C. Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the Giardia among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. *Pathog Glob Health*. 2016 Oct — Dec;110(7–8):316–320.
  14. Minvielle M.C., Molina N.B., Polverino D., Basualdo J.A. First genotyping of Giardia lamblia from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):98–103.
  15. Sulaiman I.M., Fayer R., Bern C., Gilman R.H., Trout J.M., Schantz P.M. et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of Giardia duodenalis. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(11):1444–1452.
  16. Tamer G.S., Kasap M., Er D.K. Genotyping and phylogenetic analysis of Giardia duodenalis isolates from Turkish children. *Med Sci Monit*. 2015;21:526–532. [PMC free article] [PubMed].
  17. Sprong H., Cacciò S.M., van der Giessen JW. Identification of zoonotic genotypes of Giardia duodenalis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(12):e558.
  18. Hill D.R., Nash T.E. Giardiasis. In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J., editors. *Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice of Infectious Disease*. Vol. 281. Saunders: Elsevier; 2015. pp. 3154–60.e3.
  19. El-Nahas H.A., Salem D.A., El-Henawy A.A., El-Nimr H.I., Abdel-Ghaffar H.A., El-Meadawy A.M. Giardia diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Jan-Feb;84(1):44–49.
  20. Jahan N., Khatoon R., Ahmad S. A comparison of microscopy and enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Giardia lamblia in human faecal specimens. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(11):DC04–06.
  21. Singhal S., Mittal V., Khare V., Singh Y.I. Comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent assay and direct microscopy for the diagnosis of Giardia intestinalis in fecal samples. *Indian J Pathol Microbiol*. 2015;58(1):69–71.
  22. Al-Saeed A.T., Issa S.H. Detection of Giardia lamblia antigen in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assay. *East Mediterr Health J*. 2010; 16(4):362–364.
  23. Hasan S.M.T., Maachee M., Cyrdova O.M., Diaz dela Guardia R., Martins M., Osuna A. Human secretory immune response to fatty acid-binding protein fraction from Giardia lamblia. *Infect Immun*. 2002. 70: 2226–2229.
  24. МУ 3.2.1173–02 Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний <http://docs.cntd.ru/document/1200031449>
  25. Weitzel T., Dittrich S., Möhl I., Adusu E., Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for Giardia and Cryptosporidium in stool samples. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:656–9.
  26. Dhanabal J., Selvadoss P.P., Muthuswamy K. Comparative study of the prevalence of intestinal parasites in low socioeconomic areas from South Chennai, India. *J Parasitol Res* 2014;2014:630968.
  27. Duffy T.L., Montenegro-Bethancourt G., Solomons N.W., Belosevic M., Clandinin M.T. Prevalence of giardiasis in children attending semi-urban daycare centres in Guatemala and comparison of 3 giardia detection tests. *J Health Popul Nutr* 2013;31:290–3.
  28. Heyworth M.F. Diagnostic testing for Giardia infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014 Mar. 108 (3):123–5.
  29. Усенко Д.В., Конаныхина С.Ю. Современные аспекты диагностики и лечения лямблиоза. *Вопросы современной педиатрии*. 2015. Т. 14. № 1. С. 108–113.
  30. Бехтерева М.К., Луппова Н.Е., Корниенко Е.А., Минина С.Н., Новикова В.П., Осмаловская Е.А., Приворотский В.Ф., Староверов Ю.И., Ткаченко М.А., Шабалов Н.П., Гончар Н.В., Панфилова В.Н., Ямолдинов Р.Н., Бельмер С.В., Хавкин А.И., Нижевич А.А. Рабочий протокол диагностики и лечения лямблиоза у детей. *Вопросы детской диетологии*. 2013. Т. 11. № 6. С. 72–77.
  31. Гурина О.П., Дементьева Е.А. Иммунологические аспекты лямблиоза у детей. *Российский иммунологический журнал*. 2008. Т. 2(11). № 2–3. С. 245.