

Диагностика и лечение лямблиоза у детей

Е.А. Корниенко, С.Н. Минина, С.А. Факина, Н.М. Калинина, А.Н. Суворов

Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Детская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург

Целью работы были сравнительная оценка существующих методов диагностики лямблиоза и совершенствование его лечения. 280 детей в возрасте от 4 до 17 лет были обследованы с использованием копроскопии с окраской 1% раствором Люголя, определения антител к лямблиям в крови методом ИФА, определения антигена лямблий в кале методом ИФА, определения ДНК лямблий в кале методом ПЦР. У 149 детей диагностирован лямблиоз (53,2%). Методом твердофазного ИФА исследован уровень про- (IL-8, IFN-γ) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов в биоптатах слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (СО ДПК), взятых во время эндоскопии, а также уровень секреторного иммуноглобулина А (SIgA) в слюне. В зависимости от схемы проводимой противолямблиозной терапии пациенты были разделены на 4 группы: дети 1-й группы получали нифуратель (макмирор) 10 дней; 2-й группы – метронидазол (трихопол) 10 дней; 3-й группы – албендазол (немозол) 7 дней, 4-й группы – на фоне 10-дневной терапии трихополом пробиотик «Линекс®» до 14 дней. Через 2 недели исследование повторено. Сравнительная оценка информативности методов диагностики лямблиоза показала, что чувствительность копроскопии составляет 96,1%, ПЦР – 79,6%, ИФА кала – 23,5%, ИФА крови – 36,5%. Эффективность монотерапии макмирором составила 21,4%, трихополом – 12,5%, немозолом – 33%. Параллельное назначение линекса повысило эффективность лечения до 70%, при этом улучшалась переносимость терапии и устранялись дисбиотические нарушения. На фоне лямблиоза отмечено повышение IL-8, IL-10 в СО ДПК, выявлен дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, соотношение IL-10/IFN-γ.

Лямблиоз является одной из наиболее распространенных паразитарных инвазий: по данным ВОЗ, им страдают примерно 20% детей в мире [1]. Лямблии, паразитируя в кишечнике, нарушают структуру и функцию тонкой кишки, приводя к рецидивирующим или упорным клиническим проявлениям, как правило, сочетающим болевые, диспепсические и астенонервотические симптомы. Эти симптомы не имеют специфичности, сходны с таковыми при других вариантах патологии гастродуоденальной зоны, кишечника, желчевыводящих путей. Поэтому успех лечения зависит, прежде всего, от точной диагностики лямблиоза.

Несмотря на то, что лямблиоз известен уже давно, до сих пор существуют серьезные проблемы в его диагностике. Традиционно диагноз устанавливают по обнаружению цист или трофозоитов в образцах фекалий или дуоденальном содержимом [2]. Эффективность простой микроскопии кала составляет около 50% из-за характерной прерывистости в цистовыделении, связанной с особенностями размножения трофозоитов лямблий [3]. Длительность «немых» промежутков составляет 8–12 дней, а по мнению некоторых специалистов – до 14 дней [4]. Причина прерывистого выделения цист не изучена, многие видят ее в изменении иммунореактивных свойств макроорганизма. Сложность представляет также идентификация атипичных цист. По данным Wahtquist S.P. и соавт. (1991) [4], точность диагностики повышается при повторных исследованиях. В связи с этим многие авторы предлагают проводить обследование трехкратно. Для лучшей визуализации цист рекомендуется окрашивание мазка 1% раствором Люголя.

В связи со сложностями диагностики лямблиоза в последние годы активно разрабатываются новые, более эффективные методы. В частности, в настоящее время на практике используют выявление специфических антигенов в фекалиях и специфических антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) [5]. Чувствительность и специфичность этих иммунологических методов варьирует в зависимости от состава и качества использованных диагностических наборов. В частности, существует проблема перекрестных реакций антигенов лямблий с другими паразитарными и соматическими антигенами, которые дают ложноположительные результаты. Поэтому для повышения надежности и достоверности диагностики лямблиоза рекомендуется комплексное при-

менение тестов на антитела и антигены [4]. В последние годы появилась возможность и для молекулярно-генетической диагностики лямблиоза методом ПЦР. Сравнительное изучение информативности этих современных методов у детей практически не проводилось.

Не менее проблематичным остается и вопрос о выборе оптимальных схем лечения лямблиоза. Результаты клинических наблюдений показывают, что существующие методы лечения не всегда эффективны [6]. В последнее десятилетие повсеместно отмечается рост резистентности паразитов к традиционным химиопрепаратам. Это относится к большинству применяемых препаратов, в том числе к наиболее часто и широко используемой группе нитроимидазолов. При рассмотрении случаев устойчивости лямблий к метронидазолу показано, что она обусловлена токсическим, мутагенным влиянием препарата на паразитов вследствие образования свободных радикалов [7]. Резистентность к нитроимидазолам может снижать и эффективность комбинированной терапии, например, сочетания метронидазола и албендазола [8]. Поэтому поиск новых оптимальных схем противолямблиозной терапии не теряет своей актуальности.

Цель работы

Целью работы были сравнительная оценка существующих методов диагностики лямблиоза и совершенствование его лечения.

Материал и методы

Из 280 больных, обследованных с подозрением на лямблиоз в гастроэнтерологическом отделении Детской клинической больницы № 5 им. Н.Ф. Филатова (Санкт-Петербург), данная паразитарная инвазия была обнаружена у 149, что составило 53,2%. Возраст больных колебался от 4 до 17 лет, девочки и мальчики были представлены примерно поровну. Для диагностики лямблиоза были использованы следующие методы: микроскопия кала с окраской 1% раствором Люголя, определение антител к лямблиям в крови методом ИФА, определение антигена лямблий в кале методом ИФА, определение ДНК лямблий в кале методом ПЦР.

Микроскопия кала (копроскопия). Непосредственно перед микроскопией готовили тонкий мазок: на предметное стекло

наносили одну каплю теплого (37°) 1% раствора Люголя, затем немного фекалий, растирали до получения равномерной негустой эмульсии, накрывали покровным стеклом. При правильном приготовлении мазка через него можно видеть газетный шрифт. Микроскопия проводилась при десятикратном, затем – при сорокакратном увеличении, в том числе для дифференциальной диагностики протозоидов.

Определение антигена лямблий в кале методом ИФА. Для диагностики использовали набор DRG® Giardia lamblia Ag (stool) EIA-3477 (США), который основан на быстром двухшаговом иммуноферментном анализе и предназначен для качественного определения антигена лямблий с использованием иммобилизованных и конъюгированных с пероксидазой хрена кроличьих поликлональных антител.

Определение антител к лямблиям в крови методом ИФА. Для диагностики использовали набор реагентов «Лямблия-антитела-ИФА-Бест», предназначенный для определения иммуноглобулинов классов G, M, A к антигенам лямблий в сыворотке крови человека на твердофазном носителе. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены лямблий, иммобилизованные в лунках планшетов, смесь пероксидазных конъюгатов антител к IgG, IgM, IgA человека, положительный и отрицательный контрольные образцы.

Определение ДНК лямблий в кале методом ПЦР. Экстракция ДНК проводилась при помощи фенол-хлороформа из образцов фекалий, ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-экспресс» (НПФ «Литех», Москва) согласно инструкции производителя. С выделенной ДНК проводили ПЦР с праймерами ТР1А1/ТР1А2, специфичными для лямблий группы А, и ТР1В1/ТР1В2, специфичными для лямблий группы В. В качестве контроля проводили ПЦР этих же проб ДНК с праймерами Л-И1/Л-И2. Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1,5% агаровом геле с бромистым этидием.

Методом твердофазного ИФА мы оценили также уровень про- (IL-8, IFN-γ) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов в биоптатах слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (СО ДПК), взятых во время эндоскопии, а также уровень секреторного иммуноглобулина А (SIgA) в слюне.

Все исследования были проведены дважды: до лечения и через 2 недели после него.

В зависимости от схемы проводимой противоямблиозной терапии 149 пациентов были разделены на 4 группы: дети 1-й группы (43 человека) получали нифуратель (макмирор) в дозе 15 мг/кг 2 раза в день (максимальная доза 400 мг 2 раза в день), курс 10 дней; 2-й группы (64 человека) – метронидазол (трихопол) в дозе 20 мг/кг 2 раза в день (максимальная доза 500 мг 2 раза в день), курс 10 дней; 3-й группы (22 человека) – албендазол (немозол) в дозе 10 мг/кг 1 раз в день (максимум 400 мг 1 раз в день), курс 7 дней; 20 детей 4-й группы на фоне терапии трихополом получали также пробиотик «Линекс®» по 1 капсуле 3 раза в день в течение 14 дней.

Линекс® – пробиотик, в каждой капсуле которого содержатся лиофилизированные бактерии: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis v. liberorum*, *Enterococcus faecium*, устойчивые к действию антибиотиков. Количество пробиотических бактерий гарантируется в течение всего срока хранения препарата и составляет не менее $1,2 \cdot 10^7$.

Результаты и их обсуждение

1. Сравнительная оценка информативности современных методов диагностики лямблиоза

Результаты ИФА крови на АТ к лямблиям, проведенного у 124 человек (104 положительных при копроскопии и 20 отрицательных), совпали с результатами микроскопии кала в 38 положительных и 19 отрицательных случаях, процент совпадения

составил 45,9%. Информативность метода ИФА на антитела в сыворотке крови к лямблиям оказалась невысокой: чувствительность метода составила 36,5%, специфичность – 95%.

Среди сравниваемых иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования кала наиболее высокой точностью обладал метод ПЦР: из 70 проб исследования (это были 52 положительных при копроскопии и 18 отрицательных) совпали 41 положительный результат и 16 отрицательных. В двух случаях в отрицательных при микроскопии пробах выявлена положительная реакция ПЦР. Процент совпадения составил 81,4%, это достоверно выше ($p < 0,05$) других сравниваемых методов. При проведении ИФА кала у 80 человек (49 положительных при копроскопии и 31 отрицательный) результаты совпали в 10 положительных пробах и 29 отрицательных. У двух человек при отрицательной микроскопии копрофильтрата ИФА кала была положительной. Процент совпадения составил 48,75%.

Чувствительность и специфичность методов рассчитывались с учетом того, в какую группу (положительную или отрицательную) отнесен каждый пациент. Положительным он считался при обнаружении лямблий в кале любым из трех прямых методов: копроскопией, ИФА, ПЦР. Эти данные представлены на рис. 1.

Поскольку визуальное обнаружение лямблий в кале является прямым доказательством лямблиоза, специфичность копроскопии можно считать 100%. Наше исследование показало, что при соблюдении правильной методики приготовления препаратов данный метод обладает высокой чувствительностью, которая составляет 96,1%. Прогностическая значимость положительного результата копроскопии составила 100%, отрицательного результата – 91,8%.

Учитывая изложенные данные, чувствительность и специфичность методов была оценена также в сравнении с копроскопией. Эти данные представлены в табл. 1. Достаточно высокую чувствительность и специфичность показал метод ПЦР: 78,8% и 88,8% соответственно. Прогностическая значимость положительного результата данного метода составила 95,3%, отрицательного – 59,2%. Метод ИФА крови продемонстрировал высокую специфичность – 93,5%, но низкую чувствительность – 36,5%. Прогностическая значимость положительного результата составила 97%, отрицательного – 22%. Сходные с предыдущим методом данные получены при проведении ИФА кала: специфичность – 93,5%, чувствительность – 20,4%. Прогностическая значимость положительного результата составила 83%, отрицательного – 42,6%.



Рис. 1. Сравнительная чувствительность методов диагностики лямблиоза.

Таблица 1. Чувствительность и специфичность методов диагностики лямблиоза в сравнении с копроскопией.

Метод	Чувствительность	Специфичность	ПЗ+	ПЗ–
ИФА крови	36,5	95	97	22
ИФА кала	20,4	93,5	83	42,6
ПЦР кала	78,8	88,8	95,3	59,2

ПЗ+ – прогностическая значимость положительного результата;
 ПЗ– – прогностическая значимость отрицательного результата.

Таким образом, наиболее информативными методами диагностики лямблиоза являются метод копроскопии с окраской 1% раствором Люголя и ПЦР копрофильтрата. ИФА кала и ИФА крови имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность. Обнаружение антител к лямблиям в крови, по нашему мнению, должно быть основанием для более тщательного поиска паразитов в кале методами копроскопии или ПЦР.

2. Сравнительная оценка эффективности противолямблиозной терапии

Монотерапия всеми примененными нами противолямблиозными препаратами оказалась недостаточно эффективной во всех трех (1, 2, 3) исследуемых группах. Эрадикация лямблий была достигнута при монотерапии макмирором у 21,4% больных, трихололом – у 12,5%, немозолом – у 33% (рис. 2).

При самой низкой эффективности лечение трихололом сопровождалось самым большим числом побочных реакций: тошнотой (14%), металлическим вкусом во рту (18%). У одного



Рис. 2. Сравнительная эффективность противолямблиозной терапии.

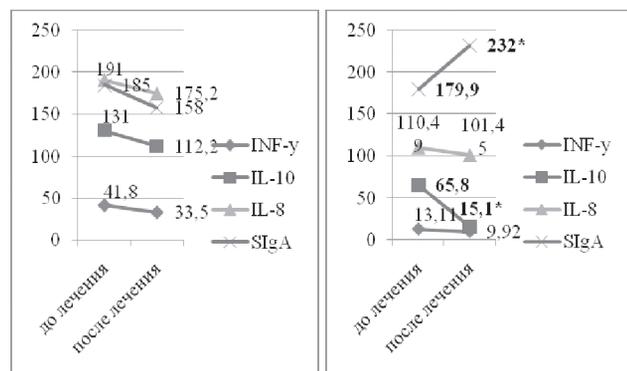


Рис. 3. Изменение уровня цитокинов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки и уровня секреторного иммуноглобулина А в слюне на фоне лечения лямблиоза с включением пробиотика Линекс (справа) и без него (слева): IL-8 – интерлейкин 8, INF-γ – интерферон-гамма, IL-10 – интерлейкин 10, SIgA – секреторный иммуноглобулин А.

ребенка (2,5%), получавшего макмирор, отмечена аллергическая сыпь. Побочных реакций на немозол не было ни у одного из получавших его детей.

Включение в схему пробиотика «Линекс®» позволило существенно повысить эффективность терапии: его назначение на фоне трихолола позволило достичь эрадикации лямблий у 70% больных. Побочных реакций не наблюдалось ни у одного пациента.

Назначение пробиотика существенно влияло на характер кишечной микрофлоры. Так, при назначении монотерапии противолямблиозными препаратами дисбиотические отклонения в кишечнике нарастали: снижение содержания бифидо- и лактобактерий наблюдалось у 82% детей, частота обнаружения условно патогенных микробов увеличилась до 42%. При включении в схему лечения линекса у всех детей наблюдались позитивные изменения кишечного биоценоза в целом. Снижение содержания бифидо- и лактобактерий было выявлено лишь у 30% детей, увеличение количества кишечной палочки с измененными биохимическими свойствами было обнаружено только у 12,5%, а рост условно патогенной флоры отмечен лишь у 6,2% пациентов.

3. Изменение уровня про- и противовоспалительных цитокинов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки (СО ДПК) и SIgA в слюне на фоне лечения лямблиоза

Изучение уровня про- и противовоспалительных цитокинов в СО ДПК показало, что при лямблиозе у 80,5% детей был значительно повышен уровень противовоспалительного цитокина IL-10 (в среднем составил $144,3 \pm 50,4$ пг/мг). Повышение уровня провоспалительного хемокина IL-8 отмечено у 61% детей (средний уровень составил $191,6 \pm 43,4$ пг/мг), уровень противовоспалительного цитокина IFN-γ был повышен лишь у 5,5% больных, а его средний уровень не превышал норму и составил $33,2 \pm 12,3$ пг/мг. Уровень секреторного иммуноглобулина А (SIgA) в слюне был снижен у 45% больных, но средний уровень не отличался от нормы и составил $185,6 \pm 31,1$ пг/мг; у 10% отмечено повышение SIgA. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов (IL-10/IFN-γ) составило 6,8, т.е. в СО значительно преобладали противовоспалительные цитокины.

На фоне монотерапии противолямблиозными препаратами отмечено незначительное снижение уровня всех исследованных цитокинов в СО ДПК. Введение пробиотика «Линекс®» в схему лечения лямблиоза существенно меняло цитокиновый статус СО ДПК: наблюдалось достоверное снижение ($p < 0,05$) уровня противовоспалительного цитокина IL-10, а также достоверно повышался ($p < 0,05$) уровень SIgA в слюне. Содержание провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN-γ сохранялось на исходном уровне (рис. 3). Соотношение IL-10/IFN-γ на фоне терапии лямблиоза с применением линекса до лечения составило 5,0, после эффективного лечения это соотношение достигло 0,88 ($p < 0,05$).

Таким образом, включение пробиотика «Линекс®» в курс противолямблиозной терапии характеризовалось повышением результативности терапии, значительным снижением уровня противовоспалительных цитокинов, повышением SIgA.

Проведенное исследование показало, что при лямблиозе, вероятно, за счет раздражения клеток кишечного эпителия, значительно повышается продукция последними хемокина IL-8. Нами обнаружено существенное повышение уровня противовоспалительных цитокинов (IL-10) в СО ДПК на фоне почти нормального уровня провоспалительных (IFN- γ). Это свидетельствует о преимущественно Th2-ответе Т-хелперов при лямблиозе. Учитывая, что Th2-ответ предрасполагает к аллергии, этим можно объяснить типичную для лямблиоза эозинофильную инфильтрацию СО ДПК, а также повышение уровня эозинофилов в периферической крови и склонность детей с лямблиозом к аллергическим реакциям. Эрадикация лямблий сопровождается достоверным снижением преимущественно противовоспалительных цитокинов, т.е. нормализацией соотношения Th1/Th2.

Полученные результаты свидетельствуют о способности пробиотиков нормализовать про- и противовоспалительный тканевой ответ за счет снижения противовоспалительных цитокинов. Вероятно, пробиотики (т.е. входящие в их состав живые бактерии) вызывают переключение дифференцировки Т-хелперов с Th2 на Th1, тем самым активируя воспалительную реакцию организма и способствуя элиминации паразитов. Повышению эффективности лечения на фоне пробиотика способствует и активация секреции SIgA.

На основании полученных данных можно рекомендовать включение пробиотика «Линекс®» в схему противоямблиозной терапии для повышения ее эффективности.

Выводы

1. Наиболее информативными методами диагностики лямблиоза являются метод копроскопии с окраской 1% раствором Люголя и ПЦР копрофильтрата. ИФА кала и ИФА крови имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность.

2. Среди наиболее широко используемых противоямблиозных препаратов (метронидазол, нифуратель, албендазол) ни один не обладает высокой эффективностью при монотерапии.

3. Включение пробиотика «Линекс®» в схему лечения лямблиоза на фоне противоямблиозного препарата существенно повышает эффективность и переносимость терапии.

4. Включение пробиотика «Линекс®» в схему лечения лямблиоза улучшает состояние биоценоза кишечника и способствует устранению дисбиотических нарушений.

5. Пробиотик «Линекс®» нормализует уровень про- и противовоспалительных цитокинов, усиливает продукцию SIgA, способствуя элиминации паразитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельмер С.В. Лямблиоз у детей // Рус. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 3. – С. 141–144.
2. Азафонова Е.В., Долбин Д.А., Куликов С.Н. и др. Современные аспекты диагностики лямблиоза у человека // Рус. мед. журн. – 2008. – Т. 16, № 17. – С. 146–149.
3. Adam R.D. Biology of Giardia lamblia // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 14. – P. 447–475.
4. Авдюхина Т.И., Константинова Т.Н., Кучеря Т.В. и др. Лямблиоз: Учебное пособие. – М.: РМАПО, 2003. – 34 с.
5. Faubert G. Immune Response to Giardia duodenalis // Clinical Microbiology Reviews. – 2000. – Vol. 1. – P. 35–54.
6. Gardner T.B., Hill D.R. Treatment of giardiasis // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – No. 14. – P. 114–128.
7. Escobedo A.A., Nunez F.A., Moreira I. Comparison of chloroquine, albendazole and tinidazole in the treatment of children with giardiasis // Annals of Tropical Medicine & Parasitology. – 2003. – Vol. 97 (suppl. 4). – P. 367–371.
8. Nash T.E. Treatment of Giardia lamblia infections // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2001. – Vol. 20. – P. 193–196.