



Лабораторная диагностика гельминтозов: комплексный подход

Больница МЦ УД ПРК

Врач КДЛ Дудкина Лариса Васильевна



Актуальность проблемы

По данным Всемирной организации здравоохранения, основными паразитарными инфекциями на Земле инфицировано почти 4,5 млн человек. Но это только диагностированные случаи, реальная заболеваемость намного выше. Гельминтозы на сегодняшний день остаются наиболее распространенными паразитарными болезнями человека и имеют большое значение.



В последнее время среди гельминтозов большое место занимают так называемые микст-инвазии, диагностика которых особенно трудна

В настоящее время нет универсального, простого, доступного и надежного метода диагностики гельминтозов.

***Будем помнить, как много
жизней было спасено, как
много ужасных страданий
было предотвращено
благодаря знаниям о
паразитических червях...***

Ч.Дарвин, газета «ТАЙМС», 1881

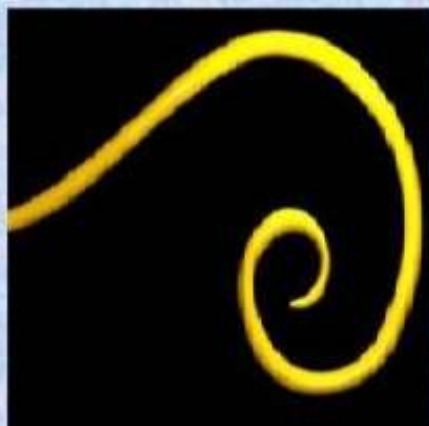


Гельминтозы — наиболее распространенные паразитарные заболевания человека, вызываемые различными представителями низших червей — гельминтов. Возбудители болезней человека относятся к двум типам гельминтов: круглые черви *Nemathelminthes* (класс *Nematoda*), плоские черви *Plathelminthes*, класс ленточных червей

Классификация паразитических червей (гельминтов) человека.

гельминты

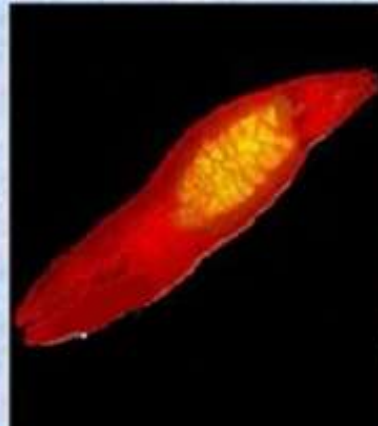
Класс
Круглые
черви



Класс
Ленточные
черви



Класс
Сосальщнки





Симптомы паразитарной инвазии:

- аллергическая реакция (зуд и покраснение кожи, сухой или влажный кашель, одышка);
- повышение температуры тела;
- снижение аппетита, боль в животе, понос, тошнота или рвота;
- головная боль, повышенная утомляемость;
- в анализе крови – эозинофилия, лейкоцитоз, нарушение функций белка.
- токсико-аллергические реакции;
- кровотечения, которые проводят к анемии;
- образование кишечной непроходимости из-за закрытия просвета кишечника гельминтами;
- авитаминоз и нарушение обмен веществ в организме.



Можно ли выполнить анализы сразу на все гельминты?

- Общее количество гельминтов, способных паразитировать в человеческом организме около 300 видов, наиболее часто встречаемые-около 30. Ни одна лаборатория не выполняет такой спектр исследований.
- Выбор тестов остается за лечащим врачом. При наличии четкой симптоматики бывает достаточно копроовоскопии (кал на яйца гельминтов) и 2-3 серологических анализов.
- Наличие общих симптомов-эозинофилии, анемии, устойчивой к стандартному лечению; дебют бронхиальной астмы или обструктивного бронхита являются показанием к назначению нескольких видов тестов.



Методы исследования

- **Прямые**-непосредственное выявление самих гельминтов, их яиц и личинок(различные модификации овоскопии, исследования дуоденального содержимого и др. биологических жидкостей, соскоб на энтеробиоз).
- **Косвенные**-выявление вторичных изменений, возникающих в организме в результате жизнедеятельности гельминтов(иммунологические методы(ИФА), УЗИ органов, рентгеноскопические исследования)
- **Специальные**(ПЦР, кожные пробы с ослабленными токсинами, электропунктурная диагностика).



Методы овоскопии в лаборатории Больницы МЦ УД ПРК

Наряду с общеизвестным методом по КАТО, *для анализа кала на яйца глист и простейшие* в нашей лаборатории используется **УСТАНОВКА FE-5** (в основе лежит метод эфир-формалинового обогащения и седиментационного разделения)

С рабочей станцией FE-5 используется система пробоподготовки - концентратор паразитов «Paraser»- уникальная одноразовая система пробоподготовки для исследования кала, которая позволяет на этапе идентификации исключить контакт персонала с биоматериалом. Использование концентратора паразитов «Paraser» заменяет лаборанту-паразитологу просмотр 25-30 мазков





Преимущества установки FE-5

- Оптимизирует и стандартизирует методику
- Повышает производительность труда и облегчает работу лаборанта
- Улучшает эффективность диагностики (метод позволяет выявить самую низкую степень инвазии)
- Значительно снижает опасность контаминации персонала
- Не искажается морфология объектов,
- Получается 3-х мерное изображение паразитов и их яиц под микроскопом,
- Повышается достоверность идентификации





Недостатки метода ОВОСКОПИИ

- Достоверность метода не превышает 15–20 %
- Результат зависит от стадии гельминтной инвазии, времени активности гельминтов, их концентрации в исследуемом материале, профессионализма лаборанта
- Иногда положительного результата можно достичь с 8–10-го исследования
- *Например.* Особенность выделения цист лямблиями получила название «феномен прерывистого цистовыделения», при котором фазы массивного выделения цист сменяются отрицательной фазой, которая может длиться от 2–3 суток до 2–3 нед. В этот период обнаружить лямблии в кале невозможно



Серологические реакции

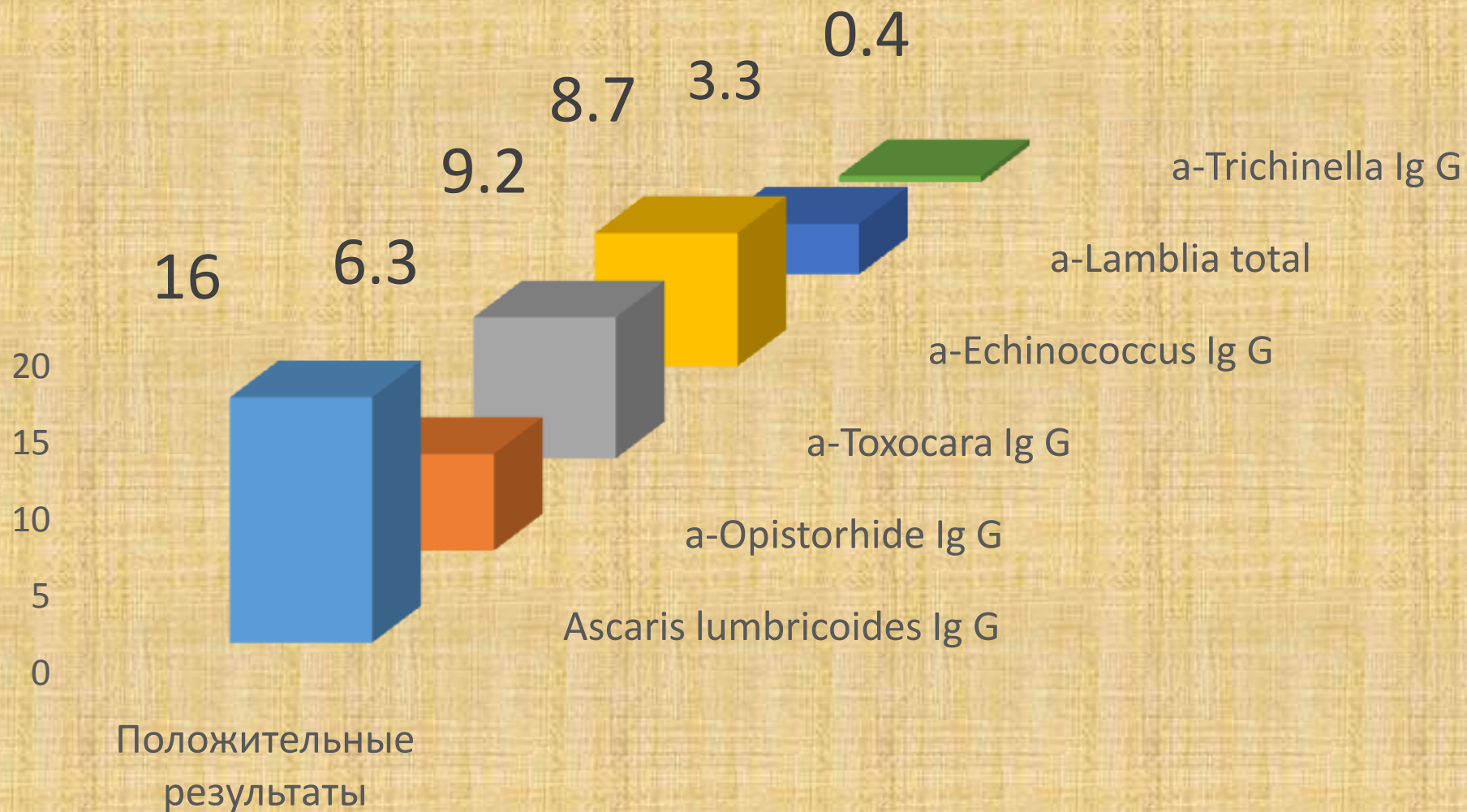
Гельминтоз	Серологические реакции	Что определяют
<i>Описторхоз</i>	ИФА, иммуноблотинг	IgG, IgM, IgA, IgE, ЦИКи, содержащие антигены описторхисов
<i>Лямблиоз</i>	ИФА	Суммарные антитела (класса А,М,Г) к лямблиям
<i>Аскаридоз</i>	ИФА	IgG
<i>Токсокароз</i>	ИФА, иммуноблотинг	IgE, IgG
<i>Трихинеллез</i>	ИФА, непрямая РИФ, латекс-агглютинация, РНГА, иммуноблотинг	IgG, IgE
<i>Эхинококкоз</i>	ИФА, РНГА, реакция латекс-агглютинации	IgG
<i>Стронгилоидоз</i>	ИФА, иммуноблотинг	IgG
<i>Клонорхоз</i>	ИФА, иммуноблотинг, РНГА, непрямая РИФ	IgG
<i>Парагонимоз</i>	ИФА, иммуноблотинг	IgG
<i>Цистицеркоз</i>	ИФА, РНГА, иммуноблотинг	IgG

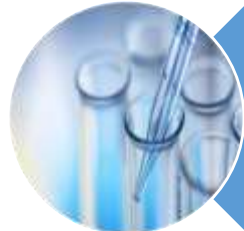
- 
- **Иммунологическое исследование крови** позволяет определить наличие антигенов и антител к гельминтам, достоверность зависит от количества и жизненного цикла гельминтов в организме. Иммуноферментный анализ обладает высокой чувствительностью и специфичностью, которая составляет 90 %, дает возможность определения вида гельминтов, их количества, прослеживания динамики развития процесса, на который указывает уровень антител.
 - **При серологическом исследовании** определяют наличие антител к гельминтам: при подозрении на эхинококкоз, цистицеркоз, трихинеллез, токсокароз широко используют реакции непрямой гемагглютинации, агглютинации латекса, связывания комплемента, иммунофлюоресценции.

Кроме того, в иммунодиагностических реакциях используются соматические антитела, а в организме хозяина антитела вырабатываются в основном на экскреты и секреты гельминта. Неспецифическая сенсibilизация организма, общность некоторых антигенов трематод, простейших и человека создают высокий удельный вес ложноположительных реакций в титрах ниже достоверно диагностических.



Положительные результаты ИФА-исследований на гельминты за 3квартал 2017





Тактика ведения пациентов с положительным результатом ИФА

Гельминтоз	Положительный результат	Отрицательный результат	Комментарии
Токсокароз	Титр 1:800 и более КП 4,4-6,0 свидетельствует об инвазии; титры 1:200-1:400 КП 1,4-4,4 токсокароносительство или глазная форма инвазии, недавнее инфицирование, малые титры (1:100) КП1,4-наблюдаются при перекрестных реакциях с другими нематодами, ошибке лаборатории	Организм не встречался с антигенами токсокар	При необходимости анализ повторяется в другой лаборатории или с интервалом в 3-4 недели Токсокароносители выполняют повторные исследования сначала 1 раз/6 мес., затем раз в год
Аскаридоз	Был контакт с антигенами <u>аскариды человеческой</u> , диагноз неясен до получения положительного результат анализа кала на яйца гельминтов, возможны перекрестные реакции с другими нематодами	Не было контакта с аллергенами аскариды человеческой	Диагноз "аскаридоз" подтверждается ТОЛЬКО положительным результатом анализа кала на яйца гельминтов



Тактика ведения пациентов с положительным результатом ИФА

Описторхоз

1:400 -1:800 и выше свидетельствуют об инвазии, малые титры могут наблюдаться при хроническом описторхозе, малом сроке после заражения, перекрестных реакциях с другими гельминтами

Организм не встречался с антигенами описторха, может быть при длительном заболевании

При необходимости анализ повторяют через 3-4 нед

Эхинококкоз

Титры значительно выше диагностического 1:800 и выше, свидетельствуют о наличии инвазии, малые положительные титры могут быть при недавнем заражении, перекрестных реакциях с другими гельминтозами

Не было контакта с аллергенами эхинококка



НОВЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕЛЬМИНТОЗОВ И ПРОТОЗОЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

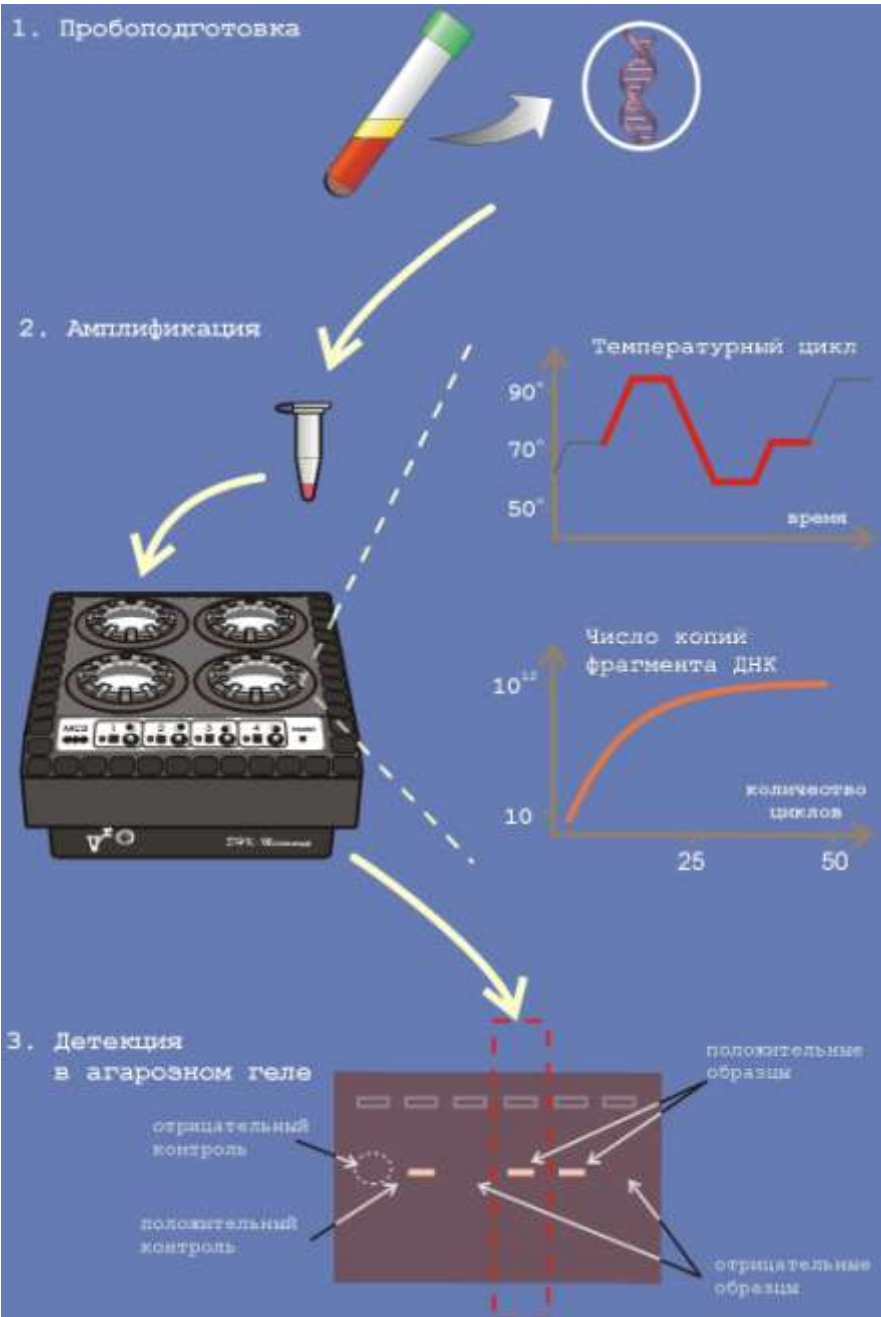
- Предлагаем Вашему вниманию новинки 2016 года – тест-системы для быстрой и эффективной диагностики основных видов гельминтозов и протозойных инфекций. Производитель-ооо"Альфалаб" г Санкт-Петербург
- **Генетический код** – матрица для синтеза белков любого организма, от вируса до человека. Для каждого вида ДНК имеет уникальные «метки», которые и определяются с помощью ПЦР
- Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет определить даже очень низкое содержание ДНК возбудителя, что существенно повышает эффективность диагностики и вероятность выявления паразитов в периоды снижения их активности



Почему ПЦР ?



- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – молекулярно-биологическая реакция, позволяющая быстро получить большое количество копий конкретного фрагмента ДНК
- Искомый фрагмент может быть частью очень сложной смеси нуклеиновых кислот
- Исходным материалом для ПЦР может быть даже единственная молекула ДНК
- ПЦР позволяет быстро получить детектируемое количество ДНК

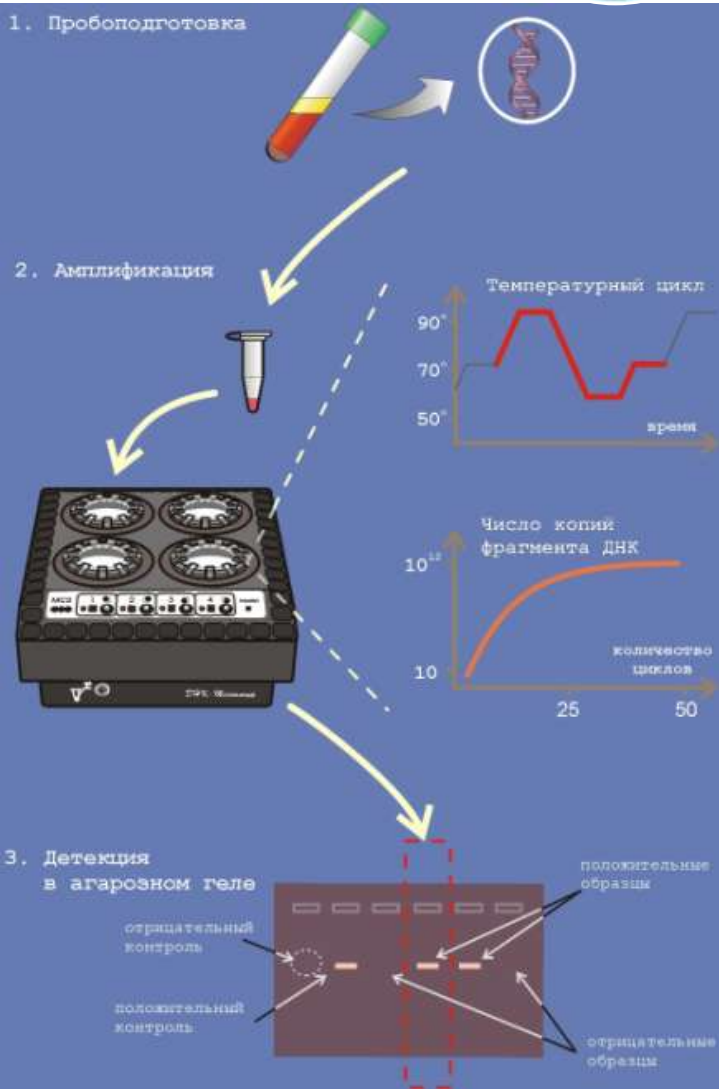


Особенности метода

- Прямой метод
- Высокая чувствительность
- Высокая специфичность
- Универсальность
- Воспроизводимость
- Скорость
- Технологичность
- Возможность работы практически с любым биологическим материалом

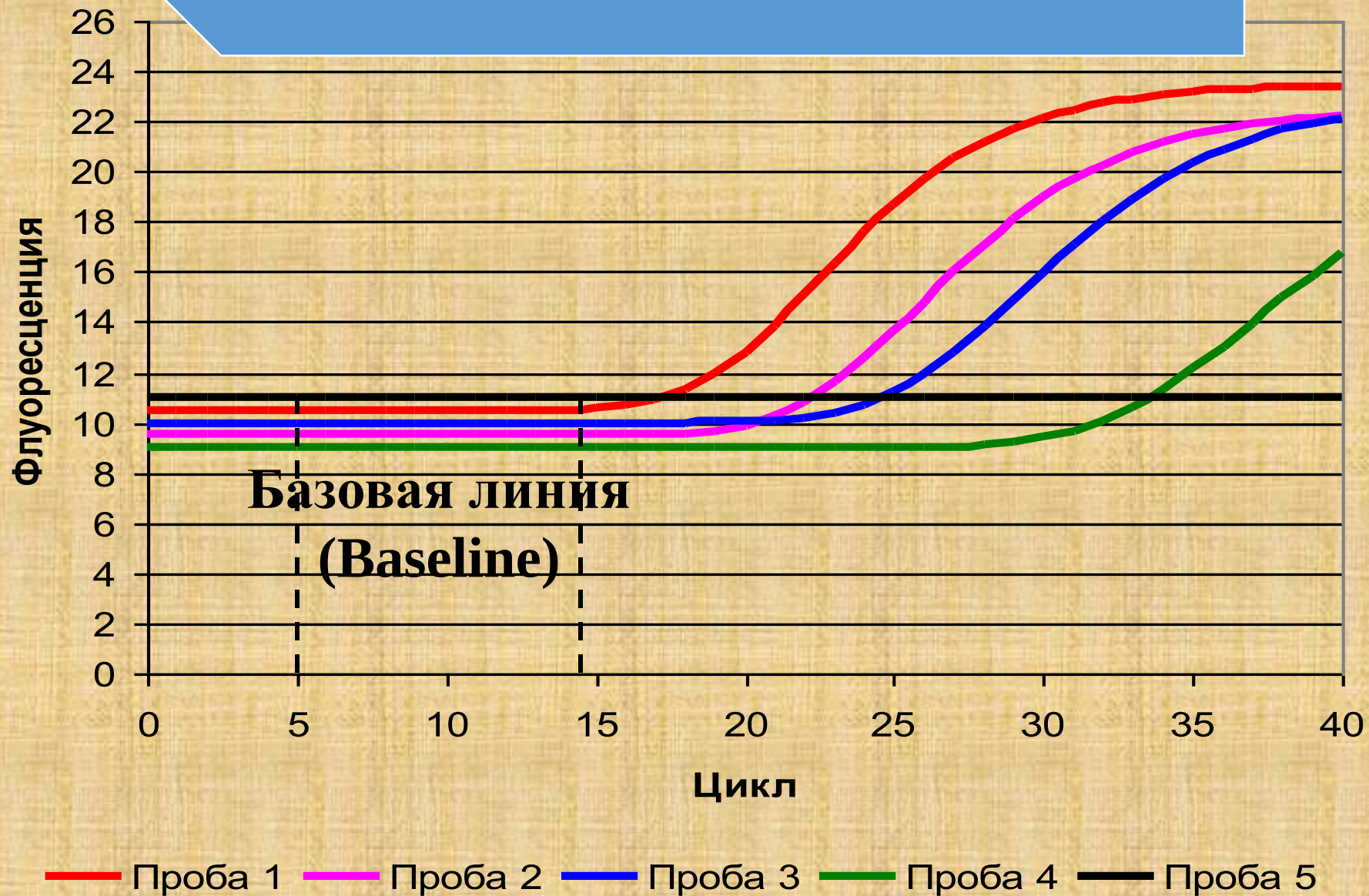


Особенности «флуоресцентной» ПЦР



- Высокая чувствительность
 - Высокая специфичность
 - Универсальность
- +
- Решение проблемы контаминации
 - Возможность количественного анализа
 - Технологичность

Анализ результатов ПЦР-РВ





ПЦР-диагностика гельминтозов ПРОТО-СКРИН и ГЕЛЬМО-СКРИН

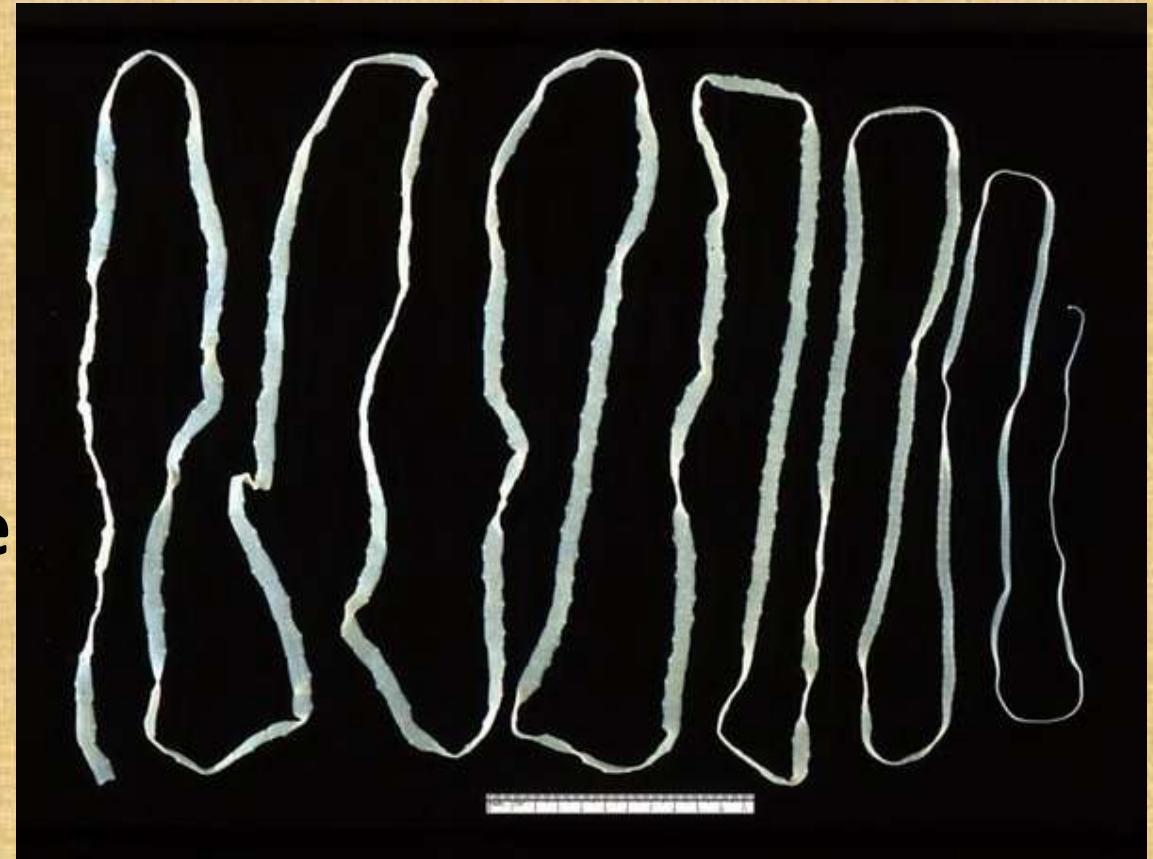
- **Гельмо-скрин** – В одном анализе высокоточное определение 5 основных гельминтозов. Набор для обнаружения ДНК возбудителей гельминтозов (энтеробиоз, аскаридоз, дифиллоботриоз, описторхоз, тениоз) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в фекальных образцах человека
- **Прото-скрин** - Диагностика 6 возбудителей протозоозов в одном анализе. Набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей протозойных инфекций (лямблиоз, амебиоз, бластоцистная инвазия, криптоспориоз, изоспороз) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в фекальных образцах человека



ПЦР-диагностика гельминтозов ПРОТО-СКРИН и ГЕЛЬМО-СКРИН

«**Гельмо-скрин**» - обнаружение ДНК возбудителей гельминтозов

- *Ascaris lumbricoides*
- *Enterobius vermicularis*
- *Opisthorchis felinus*
- *Taenia solium*
- *Diphyllobothrium latum* в кале





ПЦР-диагностика гельминтозов ПРОТО-СКРИН и ГЕЛЬМО-СКРИН

«**Прото-скрин**» - обнаружение ДНК возбудителей протозойных инфекций:

- *Lamblia intestinalis* Giardia
- *Blastocystis hominis*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Isospora belli*
- *Cryptosporidium parvum*
- *Entamoeba histolytica*





Преимущества тест-систем гельмо- и прото-скрин на основе ПЦР

- **Метод ПЦР в реальном времени обеспечивает быстроту исследования (1 рабочий день) и одновременно с этим высокую специфичность (до 99%) анализа, что делает возможным максимально оперативно получить информацию о наличии ДНК возбудителей основных видов гельминтозов и протозойных инфекций в фекальных образцах**
- **Высокая чувствительность метода ПЦР позволяет определить даже очень низкое содержание ДНК возбудителя, что существенно повышает эффективность диагностики и вероятность выявления паразитов в периоды снижения их активности**
- **Метод неинвазивный-материалом для исследования являются фекальные образцы и ректальные мазки (для диагностики энтеробиоза-преимущественно у детей)**



ВЫВОДЫ

- 1. На современном этапе нет лабораторных методов исследования на гельминтозы, которые обладают 100% надежностью**
- 2. Наибольшей достоверностью в диагностике гельминтозов обладает полимеразная цепная реакция**
- 3. Для диагностики гельминтозов рекомендуется использовать комплекс лабораторно-инструментальных методов**



Спасибо за внимание!