



Vera Lungu, Ala Halacu, Ala Gori, Irina Malanco
EVALUAREA EFICIENȚEI DIFERITOR TEHNICI DE LABORATOR
ÎN DIAGNOSTICUL LAMBLIAZEI
Centrul Național de Sănătate Publică

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF DIFFERENT LABORATORY TECHNIQUES IN THE DIAGNOSIS GIARDIASIS

Key words: *Lamblia intestinalis*, direct microscopy, ELISA-Ag, laboratory diagnostics.

Background: *Intestinal parasitary invasions still represent a public health problem. One of the most frequent is giardiasis - intestinal parasitic infection present worldwide. Its invasion has serious consequences on children public health in developing countries, it is the most frequently found intestinal protozoa. Recent studies perfected in Germany and USA show that this parasitic infection is still a threat to the developed countries worldwide.*

Material and methods: *The article presents the investigation results of 516 examined stool samples from people with different pathologies of the gastrointestinal tract. The samples were examined by direct microscopy method and ELISA-Ag assay.*

Results and discussion: *Lamblia intestinalis was found in 17 people ($3,3 \pm 1,6\%$), using at least one of three methods: 10 cases ($1,9 \pm 0,3\%$) by basic microscopy and using the formalin-ether enrichment technique, and 17 people ($3,3 \pm 1,6\%$) using the ELISA-Ag technique. 61 people ($11,8\% \pm 2,0\%$) were infected by other species of intestinal protozoa.*

*The results confirmed that the ELISA test - Ag is a fast and highly advantageous to determine protozoa *Lamblia intestinalis*. The method is particularly useful for confirming suspected cases of giardiasis, which were detected as negative by microscopic investigation.*

Conclusion: *However, microscopy is recommended as daily practice, being much cheaper and can also detect other species of intestinal protozoosis.*

РЕЗЮМЕ

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
В ДИАГНОСТИКЕ ЛЯМБЛИОЗА

Ключевые слова: *Lamblia intestinalis*, прямая микроскопия, ELISA-антиген, лабораторная диагностика.

Актуальность проблемы: *Кишечные паразитарные инвазии по-прежнему представляют значительную проблему для общественного здоровья. Одним из наиболее распространенных является лямблиоз – протозооз встречающийся во всем мире. Эта инвазия имеет серьезные последствия для здоровья детского населения в развивающихся странах, являясь наиболее часто обнаруженным кишечным протозоозом. Недавние исследования в Германии и США показывают, что это паразитарное заболевание остается актуальной и для развитых стран по всему миру.*

Материалы и методы: *В статье представлены данные результатов лабораторных исследований 516 проб стула взятых у пациентов с различными патологиями желудочно-кишечного тракта. Пробы были исследованы методами прямой микроскопии и определения ELISA-антигена.*

Результаты: *Было выявлено 17 человек ($3,3 \pm 1,6\%$), у которых была обнаружена *Lamblia intestinalis*, по крайней мере, одним из трех методов: у 10 человек ($1,9 \pm 0,3\%$) - методом простой микроскопии и методом формалин - эфирной концентрации и у 17 ($3,3 \pm 1,6\%$) - методом ELISA-Ag. У 61 человека ($11,8\% \pm 2,0\%$) были обнаружены другие виды кишечных простейших.*

*Полученные результаты подтвердили, что тест ELISA-Ag является быстрым и более выгодным в определение *Lamblia intestinalis*. Метод может быть использован, в особенности, для подтверждения подозрительных случаев лямблиоза, микроскопически отрицательных.*

Заключение: *Для рутинного исследования рекомендуется микроскопия мазков, метод который является более дешёвым и может быть использован для определения и других видов кишечных простейших.*

Actualitate. Invaziile parazitare intestinale mai prezintă încă o problemă importantă de sănătate publică. Una din cele mai frecvente este lambliaza (giardioza) – invazie cu o răspândire ubicvitară. Aproape 33% din persoanele din țările în curs de dezvoltare pe parcursul vieții fac giardioză [9]. Invazia are consecințe semnificative asupra sănătății publice în rândul copiilor în țările în curs de dezvoltare. Giardioza este cea mai frecvent detectată protozooză intestinală în Peru, cu o frecvență de 17,1% [2]; în Arabia Saudită cu 21,9% [6]; în Iran cu 4,1% [11]; în Turcia cu 3,23% [1].

Această parazitoză mai rămâne actuală și pentru țările dezvoltate din întreaga lume, fiind înregistrată la 2% dintre adulți și de la 6% până la 8% din copii [9]. Studiul efectuat recent în Germania a pus în evidență o pondere a invaziei de 7 - 15%, în funcție de vârsta pacientului [10]. Și în Statele Unite giardioza este o boală cu declarare obligatorie la nivel național. În perioada de raportare 2009 - 2010 numărul cazurilor raportate de Sistemul Național CDC a constituit 19403 în 2009 și respectiv 19888 în 2010. Boala a fost raportată mai frecvent la copiii cu vârsta de 1 – 9 ani [13].

În Republica Moldova, pe parcursul mai multor decenii, lambliaza n-a fost boală cu declarare obligatorie la nivel național, din care motiv a fost neglijată în toate aspectele, inclusiv în procedura de diagnosticare. Începând cu anul 2011, această protozooză a fost inclusă în lista maladiilor transmisibile raportabile, însă laboratoarele clinico-diagnostice, practic, nu efectuează investigații coprologice la lambliază.

Examinările la lambliază pot fi efectuate prin diferite metode: examinarea microscopică a probelor de scaun, metodele *ELISA* directe și indirecte, *RIF* și metode de biologie moleculară (*PCR*). Examinarea microscopică a probelor de scaun pentru identificarea chisturilor și trofozoizilor de *Lambliia intestinalis*, fie direct, fie concentrate prin metoda de formol-eter, sunt în continuare metodele cel mai frecvent utilizate pentru diagnosticul acestei parazitoză. Metodele enumerate au însă și unele neajunsuri: ele necesită mult timp și enorme eforturi de muncă, în plus mai sunt necesare și anumite abilități profesionale ale colaboratorilor de laborator. Pentru a spori eficiența depistării se recomandă să se păstreze practica de examinare a cel puțin trei probe de scaun [7]. Aceasta ar contribui la elaborarea unor tehnici de laborator care ar permite obținerea rezultatelor veridice în mod și timp util. Mai multe companii comerciale propun teste de diagnostic rapid, care sunt simple și necesită puțin timp pentru efectuare în comparație cu metodele tradiționale de detectare a lambliei. În ultimii ani, a găsit o largă răspândire metoda imunoenzimatică *ELISA* de identificare a diferitor agenți

parazitari, cu predilecție cea serologică (diagnostic indirect), bazată pe identificarea anticorpilor în ser. Această tehnică este utilă, în special, în cazurile de invazii tisulare (toxocaroză, trichineloză, echinococoză, cisticercoză, toxoplasmoză). Pentru invazii cauzate de protozoare sau helminți însă, atunci când este posibil, „standardul de aur” este reprezentat de diagnosticul direct realizat prin microscopie. O tehnică eficientă de identificare a *L. intestinalis* este și metoda copro-antigenului, care este foarte precisă la pacienții cu tulburări gastrointestinale cronice, în timp ce testele serologie sunt mai puțin precise și deci mai puțin utile pentru diagnostic [9]. Cea mai sensibilă metodă este identificarea genomului prin tehnica *PCR*, însă astfel de investigații sunt foarte costisitoare, necesită condiții speciale de colectare și păstrare a probelor și pot fi efectuate numai în laboratoare de performanță, în plus, calitatea probelor poate influența evident rezultatul, fiind posibile rezultate fals negative [3, 5, 8, 12].

Scopul acestui studiu a fost de a compara eficiența tehnicilor de microscopie directă și de detectare a copro-antigenului prin testul imunoenzimatic *ELISA-Ag* pentru identificarea *L. intestinalis*.

Actualitate. Invaziile parazitare intestinale mai prezintă încă o problemă importantă de sănătate publică. Una din cele mai frecvente este lambliaza. În total au fost examinate 516 probe de scaun de la persoane cu diferite stări patologice ale sistemului gastrointestinal, dar fără dereglări de tranzit intestinal. S-a recurs la examinarea unei singure probe de scaun. Vârsta celor examinați a fost de la 1an până la 62 ani, 437 (84,7%) din ei fiind copii cu vârsta sub 18 ani. S-au utilizat tehnicile de microscopie directă (frotiuri colorate cu soluția Lugol din material biologic nativ și concentrat prin metoda formol-eter) și de identificare a copro-antigenului prin metoda imunoenzimatică *ELISA-Ag* pentru identificarea *L. intestinalis*, cu folosirea kiturilor comerciale “Giardia lamblia *Ag-ELISA*”, producător Nova Tec Imundiagnostica GmbH Germany, cu sensibilitatea 97,5% și specificitatea 99,5%. Investigațiile au fost efectuate la baza laboratorului de referință în microbiologie și al laboratorului parazitologic a Centrului Național de Sănătate Publică în perioada anilor 2012-2013.

Rezultate și discuții În urma investigațiilor efectuate au fost identificate 17 persoane (3,3±0,6%) la care s-a depistat *L. intestinalis* cel puțin prin una din cele 3 metode. La 61 persoane (11,8±2,0%) au fost depistate alte specii de protozoare intestinale. Toate probele pozitive la *L. intestinalis* prin metoda microscopică au reacționat pozitiv și la testul *ELISA-Ag*. Numai la testul *ELISA-Ag* au reacționat pozitiv în total 7 probe (1,6±0,3%).

Tabelul 1.

Rezultatele investigațiilor de laborator la lambliază

Nr. de persoane examinate	Nr. total de probe pozitive	Ponderele afectării (%±2m)	Nr. de probe pozitive prin microscopia simplă	Nr. de probe pozitive la concentrarea în formoleter	Nr. de probe pozitive prin tehnica <i>ELISA-Ag</i>
516	17	3,3±0,6	10 1,9±0,4%	10 1,9±0,4%	17 3,3±0,6%

Prin urmare, testul *ELISA-Ag* posedă o sensibilitate mai înaltă în comparație cu microscopia simplă. Totuși, chiar dacă microscopia directă este mai puțin sensibilă ea nu trebuie neglijată din motiv că este simplă în aplicare, plus la aceasta, mai permite depistarea și altor protozoare intestinale. Pe vârste, probele pozitive s-au repartizat în felul următor: 14 (51,9%) la copii cu vârsta 1 - 5 ani; 6 (22,2%) la copii cu vârsta 6 - 10 ani; 3 (11,1%) la copii cu vârsta de 11 - 18 ani și 4 (14,8%) la adulți.

Actualmente, în laboratoarele clinico-diagnostice ale republicii a găsit o întrebuintare foarte largă identificarea diferitor agenți parazitari, inclusiv a *L. intestinalis*, în serul pacienților prin aplicarea testului serologic *ELISA-Ac*. Conform anexei nr.2 a ordinului nr. 385 din 12.10.2007 "Definițiile de caz pentru bolile transmisibile și problemele speciale de sănătate aflate sub supraveghere epidemiologică și raportare în Republica Moldova", criteriile de laborator pentru diagnosticarea lambliazei sunt:

- Evidențierea chisturilor de *L. intestinalis* în scaun;
- Evidențierea trofozoizilor de *L. intestinalis* în scaun, lichidul duodenal sau în fragmentele de biopsie din intestinul subțire;
- Evidențierea antigenului de *L. intestinalis* în scaun.

Cu regret, medicii clinicieni, în contradicție cu ordinul nominalizat, utilizează rezultatele testelor serologice (metode indirecte) în confirmarea diagnozei și tratamentul acestei maladii, precum și la evaluarea eficienței tratamentelor. Este bine cunoscut faptul că prezența anticorpilor specifici poate dezvălui o infecție dobândită, dar nu neapărat o boală. Interpretarea rezultatelor serologice poate fi dificilă atunci când pacienții sunt originari din zone în care invazia este endemică, în acest caz, o pozitivitate serică ar putea reflecta o expoziție veche la parazit, prin urmare, nu este legată de starea clinică actuală. În plus, serologia poate fi frecvent fals negativă la subiecții care nu sunt imunocompetenți (organe transplantate, persoanele infectate cu HIV, copiii prematuri, diabeticii). După recuperare are loc scăderea nivelului de anticorpi, cu toate acestea, ei pot persista pentru perioade lungi de timp, pentru care motiv testele serologice nu ajută la evaluarea rezultatelor tratamentului [4]. Drept consecință, este necesar ca rezultatele acestor teste să fie confirmate prin teste veridice.

Concluzii

1. Testul imunoenzimatic *ELISA-Ag* este o metodă rapidă și deosebit de avantajoasă pentru determinarea protozoarului *Lambliia intestinalis*. Metoda este utilă, în special, pentru confirmarea cazurilor suspectate de giardioza, microscopic-negative. Acest test, de asemenea, poate fi utilizat ca un monitor bun pentru evaluarea succesului tratamentului în lambliază.

2. Pentru practica de zi cu zi, se recomandă micro-

scopia, care este mult mai ieftină și poate detecta, de asemenea, alte specii de protozoote intestinale.

Bibliografie

1. **Alver O, Özakin C, Töre O.** The distribution of intestinal parasites detected in the Uludag University Medical Faculty Hospital between 2009-2010. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2012;36(1):17-22.

2. **Bailey C, Lopez S, Camero A, Taiquiri C, Arhuay Y, Moore DA.** Factors associated with parasitic infection amongst street children in orphanages across Lima, Peru. *Pathog Glob Health.* 2013 Mar;107(2):52-57.

3. **Behr MA, Kokoskin E, Gyorkos TW, Cédilotte L, Faubert GM, Maclean JD.** Laboratory diagnosis for Giardia lamblia infection: A comparison of microscopy, coprodiagnosis and serology. *Can J Infect Dis.* 1997 Jan;8(1):33-38.

4. **Bruschi F, Castagna B.** The serodiagnosis of parasitic infections, *Parassitologia.* 2004 Jun;46(1-2):141-144.

5. **Gofi P, Martín B, Villacampa M, García A, Seral C, Castillo FJ, Clavel A.** Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Aug;31(8):2077-2082.

6. **Hoda AT, Soliman MI, Banjar S AN.** Intestinal parasitic infections among expatriate workers in Al-Madina Al-Munawarah, Kingdom of Saudi Arabia. *Trop Biomed.* 2013 Mar;30(1):78-88.

7. **Jelinek T, peyerl G, Löscher T, Nothdurft HD.** Giardiasis in travellers: evaluation of an antigen-capture ELISA for the detection of *Giardia lamblia*-antigen in stool. *Z Gastroenterol.* 1996 Apr;34(4):237-240.

8. **Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP.** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 2003 Feb;41(2):623-626.

9. **Kappus KD, Lundgren RG, Jr., Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC.** Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(6):705-713.

10. **Terletskaia-Ladwig E, Eggers M, Enders M, Regnath T.** Epidemiological aspects of gastrointestinal infections. *Dtsch Med Wochenschr.* 2011 Jan;136(3):69-75.

11. **Vahedi M, Gohardehi S, Sharif M, Daryani A.** Prevalence of parasites in patients with gastroenteritis at East of Mazandaran Province, Northern Iran. *Trop Biomed.* 2012 Dec;29(4):568-574.

12. **Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM.** Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes.* 2003 Oct;17(5):223-225.

13. **Yoder JS, Gargano JW, Wallace RM, Beach MJ;** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis surveillance-United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ.* 2012 Sep 7;61(5):13-23.