

Кененбаева А.М., Мусаева Н.С.

СПЕЦИФИКАЛЫК ИНФЕКЦИЯ АГЕНТТЕРИНИН ИММУНДУК-ФЕРМЕНТТИК АНАЛИЗИ
(токсоплазма, микоплазма, уреоплазма)

Кененбаева А.М., Мусаева Н.С.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ
(токсоплазма, микоплазма, уреоплазма)

А.М. Kenenbaeva, N.S. Musaeva

THE ENZYME IMMUNOASSAY OF SPECIFIC INFECTIOUS AGENTS
(toxoplasma, mycoplasma, ureaplasma)

УДК: 578:579:616 (575. 2)(04)

Бул макалада спецификалык инфекция ыландарды изилдөөдөгү заманбап серологиялык метод болуп саналган Иммунодук-ферменттик анализдин мүмкүнчүлүктөрү көрсөтүлдү. Диагностикадагы айрым патологиялык абалдар жана натыйжалар таасирин тийгизүүчү факторлор практикалык мисалдарда каралды. Азыркы учурда инфекциялык ана паразиттик ыландарды жер шаарындагы адамдардын ооруусуна жана өлүмдөргө алып баруучу тез-тез кездешүүчү себеп катары караса болот. Гинекологияда жана ошондой эле венерологияда Иммунодук-ферменттик анализди микоплазма, уреоплазма, гарднереллеа, сифилис, гонорея, торч инфекцияларды, гепатиттерди, герпести жана ошол сыяктуу ыландарды изилдөөдө терен колдонулат. Токсоплазмоз - *Toxoplasma gondii* аталышындагы микроскопиялык паразиттеринин чакыруусундагы оору. Токсоплазмоз оорусун жугузүүчү эки топкогу коркунучтагылар: кош бойлуу аялдар жана иммунодефициттеги адамдар. Токсоплазмоз адамдагы көп кездешүүчү паразит оорулары болуп саналат. Микоплазмоз - микоплазма микроорганизминин чакыруусундагы оор инфекциялык илдет. Оор респиратордук илдет жана пневмония, айрым учурда башка органдарга зыян келтирүү менен коштолот. Дем алуу органдарына зыян келтирүүсү микоплазма-пневмониясынан болот. Азыркы учурда микоплазманын 40тай түрү катталган. Уреоплазма – бул жыныс органдарынын былжыр катмарында жана сийдик-тукум мүчөлөрүндө кездешүүчү майда бактерия. Башында уреоплазма микоплазмаларга кирген, бирок, мочевинаны ажыратуу жөндөмдүүлүгү менен өзүнчө түргө бөлүнгөн. Уреоплазмалар шарттуу-ылаңдаткыч микроорганизмдери болуп саналат. Алар түрлүү ооруну чакырууга ээ, бирок, ошол эле учурда аларды денсак адамдан да кездештирүүгө болот.

Негизги сөздөр: иммунодук-ферменттик анализ, антиген, антителер, уреоплазма, микоплазма, токсоплазма, ылаң, патология, анализ, плазма.

В данной статье показаны возможности современного серологического метода исследования Иммуноферментного анализа в диагностике специфических инфекционных заболеваний. Рассмотрены практические примеры диагностики отдельных патологических состояний и факторы, влияющие на результат. В настоящее время инфекционные и паразитарные болезни можно рассматривать как одну из самых частых причин заболеваемости и смертности людей на земном шаре. Иммуноферментный анализ в гинекологии, а также в венерологии широко используют для диагностики микоплазмоза, уреоплазмоза, гарднереллеа, сифилиса, гонореи, вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции, TORCH-инфекции, герпеса и т.д. Токсоплазмоз-заболевание, вызываемое микроскопическим паразитом, называемым *Toxoplasma gondii*. Существует две группы риска по заражению токсоплазмозом: беременные женщины и лица с иммунодефицитами. Токсоплазмоз является одним из самых распространенных паразитарных заболеваний у человека. Микоплазмоз - острое инфекционное заболевание, обусловленное

микроорганизмами микоплазмами. Протекает преимущественно в виде острого респираторного заболевания и пневмонии, реже поражаются другие органы. Поражение органов дыхания обусловлено микоплазменной пневмонией. В настоящее время известно свыше 40 видов микоплазм. Уреоплазмы – это мельчайшие бактерии, которые обитают на слизистых половых органов и мочевых путей человека. Сначала уреоплазмы относились к микоплазмам, но были выделены в отдельный род из-за своей способности расщеплять мочевины. Уреоплазмы являются условно-патогенными микроорганизмами. Они способны вызвать ряд заболеваний, но в тоже время нередко их выявляют и у здоровых людей.

Ключевые слова: Иммуноферментный анализ, антиген, антитело, токсоплазма, микоплазма, уреоплазма, инфекция, анализ, плазма, патология.

The article explains the possibilities of modern serological method of research-enzyme immunoassay - in the diagnosis of specific infectious diseases. Were examined the practical examples of individual diagnosis of pathological conditions, factors affecting the result. Nowadays infectious and parasitic diseases can be regarded as one of the most frequent causes of morbidity and mortality in humans on the globe. Toxoplasmosis is a disease caused by a microscopic parasite called *Toxoplasma gondii*. There are two risk groups for toxoplasmosis infection: pregnant women and those with immunodeficiencies. Toxoplasmosis is one of the most common parasitic diseases in humans. Mycoplasmosis is an acute infectious disease caused by mycoplasma microorganisms. It proceeds mainly in the form of an acute respiratory illness and pneumonia, less often other organs are affected. The defeat of the respiratory system is due to mycoplasma pneumonia. Over 40 types of mycoplasmas are currently known. Ureaplasma is the smallest bacteria that live on the mucous membranes of the genital organs and the human urinary tract. At first, ureaplasmas belonged to mycoplasmas, but were isolated into a separate genus due to their ability to break down urea. That ureaplasmas are opportunistic microorganisms. They can cause a number of diseases, but at the same time, they are often detected in healthy people.

Key words: enzyme immunoassay, antigen, antibody, toxoplasma, mycoplasma, ureaplasma, analysis, pathology, infections.

В лаборатории ИФА используют в двух направлениях: чтобы обнаружить в сыворотке больного антитела (АГ), и чтобы определить антиген (АГ) возбудителя для установления его принадлежности (видовой, родовой). Если учесть динамику синтеза отдельных классов иммуноглобулинов (Ig) в иммунном ответе, наличия антител класса IgM говорит первичной острой инфекции, тогда как обнаружение только IgG маркирует давний процесс или наличие иммунной памяти без активного заболевания [4].

Инфекционные и паразитарные болезни – одна из самых частых причин заболеваемости и смертности людей нашей планеты.

В сегодняшнее время в Кыргызстане среди инфекционных причин перинатальной патологии токсоплазмоз занимает одно из ведущих мест, что определяет его важное социально-экономическое значение [3]. Приобретенный, а также врожденный токсоплазмоз представляет собой серьезную проблему медицины. Он ответствен за определенную часть хронических вялотекущих, периодически рецидивирующих энцефалитов, миокардитов, лимфаденитов и некоторых других видов патологии органов и систем [4].

Микроорганизмы уреаплазмы вызывают инфекцию половых путей так называемую уреаплазмоз. Которая могут привести к бесплодию как женщин, так и мужчин. У мужчин снижается подвижность сперматозоидов. У женщин при длительном воспалительном процессе происходят изменения в оболочке матки и маточных трубах [3]. Исследование образцов ткани самопроизвольных выкидышей в сроках 6-10 недель беременности показало, что 47% эмбрионов были инфицированы различными видами бактерий и вирусов. Наиболее распространенными инфекциями являлись микоплазма (17%) и уреаплазма (6%).

Ежедневно во всем мире до одного миллиона людей заражаются инфекциями, передаваемыми половым путем. Главнейшими из них является микоплазмоз. С ростом этих заболеваний как уреаплазмоз и микоплазмоз, урогенитальные инфекции является актуальной проблема современного общества. Микоплазмоз – это хроническая инфекция, чаще всего поражающая мочеполовую систему, которую вызывают микоплазмы. Осложнение урогенитального микоплазмоза, уреаплазмоза у женщин: не вынашивание беременности по типу самопроизвольного выкидыша или преждевременных родов. Микоплазма ведет к таким заболеваниям как уретрит у мужчин и эндометрит и аднексит у женщин, а также является условно патогенными микроорганизмами ниже перечисленных заболеваний цистит, сальпингит, пиелонефрит, мочекаменная болезнь, артрит, конъюнктивит, сепсис аутоиммунные заболевания, менингит [2].

Полученные результаты исследования. Получение плазмы. Все анализы проходили через диагностическую лабораторию «интелмед» (лаборатория Боневского).

Определение стадии инфекционного процесса. Самыми ранними антителами являются IgM. Выявить их можно через 1-3 недели после возможного инфицирования, что характеризует острую фазу инфекционного процесса. Второе – это появление антител IgM – обострение хронического процесса. Антитела IgM ведут активный образ, в среднем около 3-х месяцев, затем их количество исчезает. Бывали случаи, когда у пациентов следовые количества IgM обнаруживали в течении 1-2 лет после инфицирования, а иногда через месяц.

Сывороточные IgA синтезируются плазматическими клетками селезенки, лимфоузлов и слизистых оболочек. Секреторные IgA концентрируются на слизистых оболочках для выполнения защитной функции - повышения иммунитета.

После инфицирования с 4-й недели начинают появляться антитела IgG. При большом количестве инфекций титр постепенно увеличивается в разные сроки (примерно 1,5-2 мес), дальше титр остается на невысоком уровне и указывает на иммунитет. При заболеваниях (хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, трихомониаз) уровень IgG не бывает высоким, потому что отсутствует иммунитет при данных инфекциях. Эти исследования помогают определить стадии инфекционного процесса.

Методика проведения анализа. Для постановки диагноза на наличие антител на токсоплазму, микоплазму и уреаплазму у пациентов в детородном возрасте. Материалом для настоящей работы служила кровь из вены пациентов в возрасте с 2000-1972 года рождения, т.е. репродуктивного возраста, которые проходили обследование на подозрение токсоплазмоза, микоплазмоза и уреаплазмоза.

Для проведения ИФА сначала берется биологический материал: плазма крови и сыворотка. Специально по схеме делается иммуно-ферментный анализ по таблице 1.

Таблица 1

Схема проведения ИФА

Внести:	По 100 мкл калибровочных растворов; по 90 мкл РРС и по 10 мкл анализируемых образцов.
Инкубировать:	30 мин 37°C
Промыть:	Промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
Внести:	По 100 мкл конъюгата.
Инкубировать:	30 мин 37°C.
Промыть:	Промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.
Внести:	По 100 мкл ТМБ
Инкубировать:	25 мин, 18-25°C, в темноте
Внести:	По 100 мкл стоп-реагента
Измерить:	Рмч П.оохОП при 450 _{нм} /референсная длина волны 620-655

Результаты ИФА регистрируются с помощью спектрофотометра, измеряется оптическая плотность в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 650 нм. До-

пускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм. Выводим спектрофотометра на нулевой уровень «бланк» осуществляется по воздуху. Интерпретация результатов проводится согласно данным по таблице 2.

Таблица 2

Интерпретация результатов ИФА

ОП сыворотки	результат	Титр Ig A
$ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$	отрицательный	-
$ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$	сомнительный	-
$ОП_{крит} + 0,05 \leq ОП_{обр} \leq 4 \times ОП_{крит}$	слабоположительный	1:5
$4 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} \leq 7 \times ОП_{крит}$	положительный	1:10
$7 \times ОП_{крит} < ОП_{обр} \leq 11 \times ОП_{крит}$	резкоположительный	1:20
$ОП_{обр} > 11 \times ОП_{крит}$	резкоположительный	1:40

Результаты интерпретации учитываются только при соблюдении следующих условий: среднее значение $ОП_{ср} - K \leq 0,25$ и значение ОП в лунке $ОП K^+ \geq 0,60$.

Тогда это вычисляется по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{ср} K^+ + 0,25$$

Где, $ОП_{ср} K^+$ - среднее значение ОП для отрицательного образца. Если $ОП K^+$, то тогда при расчете выравниваем его к нулю.

В конце наших исследований исследуемого образца оцениваем таким образом:

- положительный, т.е. значение инфекций $ОП_{обр} \geq ОП_{крит} + 0,05$;
- отрицательный, т.е. значение не содержащего антитела класса А $ОП_{обр} \leq ОП_{крит} - 0,05$;

- сомнительный, здесь значение ОП будет $ОП_{крит} - 0,05 < ОП_{обр} < ОП_{крит} + 0,05$.

Приблизительно 77% женщин детородного возраста восприимчивы к инфицированию токсоплазмы. Передачи инфекции плоду от матери приводит к серьезному нарушению, любую патологию даже его смерти.

Всего за 2 года с 2019 по 2020 годы мною обследовано 356 человек, из них у 124 обнаружены возбудители болезней, среди которых количество больных токсоплазмозом составило $n=58$, уреплазмозом $n=35$, микоплазмозом $n=31$ человек из общего количества обследованных человек (диаграмма 1).

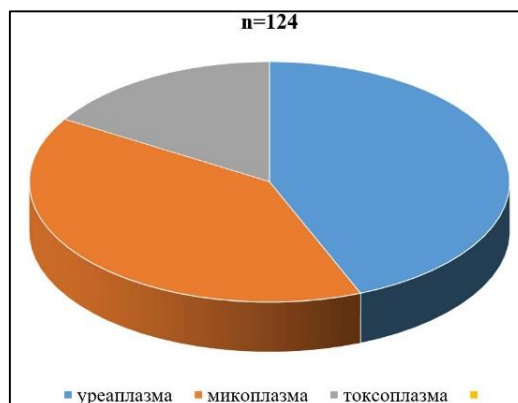


Диаграмма 1. Распределение положительно выявленных инфекций у обследованных пациентов из общего числа ($n=124$).

Анализ проводился на наличие IgM данных инфекционных агентов, что характеризуется острым (ранним) клиническим проявлением заболевания.

Из трех болезней токсоплазмоз является самой опасной и имеет высокую встречаемость. В Кыргызстане мужчины и женщины болеют с возраста от 16 до 42 лет. В возрастном отношении наибольшее количество обратившихся составили пациенты 24-25 лет. Из них большая часть составляет женщины.

Кроме того, уровень заболеваемости людей во всех временах года неодинаков. Так, в 2019 году сравнительно высокий для этого года уровень заболеваемости наблюдается в декабре, в феврале и в апреле (табл. 3). В 2020 году высокий уровень заболеваемости отмечен в январе и апреле.

Таблица 3

Количество больных прошедшие исследования микоплазмозом за 2019-2020 гг.

№	месяц	2019		2020	
		Абс. кол	%	Абс. кол	%
1.	январь	7	5	26	11
2.	февраль	12	10	21	9
3.	март	3	3	21	9
4.	апрель	19	16	29	12
5.	май	3	3	11	4
6.	июнь	11	10	20	8
7.	июль	11	10	20	8
8.	август	3	3	21	9
9.	сентябрь	11	10	7	3
10.	октябрь	7	5	22	10
11.	ноябрь	11	10	21	9
12.	декабрь	19	15	20	8
всего		117	100	239	100

Если остановимся на возрастной состав, уровень заболеваемости уреоплазмоза и микоплазмоза отличаются. Т.е. наиболее подвержены к болезням люди в возрасте 20-39 лет. Женщины составляли почти 90% среди заболевших уреоплазмозом и микоплазмозом.

Важно отметить, что большая часть рассмотренных болезней протекает в виде вялотекущих и бессимптомных формах, это скрывает их наибольшую эпидемиологическую опасность. Потому что, в результате таких заболеваний могут происходить тяжелые осложнения, как хронические заболевания органов малого таза, рождение ребенка с низкой массой тела, преждевременные роды, внематочная беременность, мертворождение, бесплодие, рак шейки матки, неонатальный конъюнктивит, недоношенность, пневмония, сепсис, врожденные дефекты и смерть новорожденных и др.

Особенность токсоплазмоза, уреа-микоплазмоза состоит в том, что при первичном заражении на ранних этапах беременности они могут оказывать пагубное действие на все системы и органы плода, особенно на его центральную нервную систему. В результате повышается формирования пороков его развития, риск выкидыша, мертворождения и врожденных уродств ребенка, вплоть до инвалидности.

Таким образом, несмотря на то, что роль микоплазм как первичного этиологического фактора при поражениях урогенитального тракта не определена и нет достоверных критериев участия микоплазм в урогенитальной патологии, мы знаем, это со сложностью лабораторной диагностики и отсутствием четких клинических симптомов, типичных для данных поражений.

Как правило, при урогенитальных микоплазмозах преобладают малосимптомные формы, в связи с

этим трудно определить длительность инкубационного периода. Активное выявление и привлечение больных к лечению остается одним из методов успешной борьбы с урогенитальными микоплазмозами, поскольку у большинства мужчин и женщин заболевание протекает хронически или в латентной форме без клинических проявлений и субъективных ощущений. Естественно, что такие лица считают себя здоровыми, самостоятельно не обращаются к врачу и остаются потенциальными источниками микоплазменной инфекции.

Выводы. Из общего числа обследованных больных (табл. 4) уреоплазмоз положительно выявлен у 67 пациентов, микоплазмоз выявлен у 48 пациентов, токсоплазмоз положительно обнаруживается только у 9 пациентов и 3 пациента выявлены как сомнительный. Уреоплазмоз и микоплазмоз чаще выявляются у женщин детородного возраста, чем токсоплазмоз. В случае ИФА диагностики инфекций можно легко определить острую, хроническую фазу заболевания или стадию ремиссии болезни.

Литература:

1. Борисенко К.К., Тоскин И.А., Кисина В.И. О значении колонизации мочеполовых органов *M. hominis* и *Urealyticum* // ИПШ. – 1999. – № 3. – С. 28-32.
2. Грачёва Л.И. и др. Эпидемиология, клиника, диагностика и лечение токсоплазмоза. Москва, 1996 г. 37. Taylor-Robinson D, Furr P.M. Genital mycoplasma infections // Wien Klin Wochenschr. – 1997. – Vol. 109(14-15). – P. 578-583.
3. Каган Г.Я., Раковская И.В. Микоплазма – инфекция в культурах ткани. – М., 1968
4. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, 2009 г.
5. Биология: учебник в 2х т., /под ред. В.Н. Ярыгин - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013