

На правах рукописи

СТЕПАНОВА ЕКАТЕРИНА ВИКТОРОВНА

Модуляция поведения человека под воздействием *Toxoplasma gondii*

03.02.11 – Паразитология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

академик РАН, д.м.н., профессор

Сергиев Владимир Петрович

Официальные оппоненты:

Козлов Сергей Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра инфекционных болезней, профессор кафедры

Гончаров Дмитрий Борисович – кандидат биологических наук, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, заведующий лабораторией протозойных инфекций

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России)

Защита состоится « ____ » _____ 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.15. при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.040.15

Доктор медицинских наук, профессор

Б.Л. ЛИХТЕРМАН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения возбудителями паразитарных болезней в мире поражено более 4,5 млрд. человек. Одной из таких болезней является токсоплазмоз, представляющий актуальную проблему перинатальной патологии, что определяет его медицинское и социально-экономическое значение. Приобретенный токсоплазмоз ответственен за часть хронических вялотекущих, периодически рецидивирующих энцефалитов, арахноэнцефалитов, миокардитов, лимфаденитов и других видов патологии органов и систем. Полиморфизм клинических проявлений и значительная частота бессимптомных форм носительства возбудителя (*Toxoplasma gondii*) создают определенные трудности в диагностике приобретенного хронического латентного токсоплазмоза. Долгое время полагали, что в отсутствии вторичного приобретенного иммунодефицита, включая ВИЧ-инфекцию, токсоплазмоз всегда асимптоматичен, однако частая ассоциация токсоплазменной инфекции с нейropsychической патологией свидетельствует, что латентная хроническая инфекция может проявляться неврологическими симптомами, что значительно увеличивает актуальность и значимость проблемы. В ходе экспериментальных исследований, было показано, что токсоплазмы могут направленно изменять (модулировать) поведение животных. Последующие наблюдения, проведённые в различных странах мира за поражёнными токсоплазмозом людьми, подтвердили существенные поведенческие изменения, включая изменения личности, снижение коэффициента интеллектуальности и измененную психомоторную деятельность (например, повышенный риск участия в дорожно-транспортных происшествиях) у заражённых по сравнению с незаражёнными людьми, что расширило представления о социально-экономическом ущербе от этой патологии.

Степень разработанности темы исследования

Проведенный автором анализ литературы и патентный поиск свидетельствуют о том, что при имеющихся узконаправленных исследованиях в некоторых странах, обобщающихся исследований по воздействию латентного хронического токсоплазмоза на человека не проводилось. В России публикации о подобных исследованиях отсутствуют.

Цель диссертационной работы:

Изучение различных проявлений изменения поведения инфицированных лиц, обусловленных хроническим латентным токсоплазмозом, и определение социальной и экономической значимости этой патологии.

Задачи исследований:

1. Проанализировать существующие в настоящее время методы диагностики токсоплазмоза и оценить их сравнительную эффективность и применимость для дифференциальной диагностики.
2. Установить частоту инфицирования *Toxoplasma gondii* в группах лиц, ставших виновниками дорожно-транспортных происшествий (ДТП), по сравнению с практически здоровыми людьми
3. Определить наличие корреляции между хроническим латентным токсоплазмозом и расстройствами психики пациентов.

Научная новизна результатов исследований:

1. Впервые в России доказан статистически значимый, более высокий уровень лиц серопозитивных к антигенам токсоплазм в группе индивидуумов, ответственных за совершение ДТП, по сравнению с нормальной популяцией, что определяет причинно-следственную связь неадекватного социально опасного поведения с наличием хронической токсоплазменной инфекции, как одного из факторов развития девиантного поведения человека.
2. Показано, что среди лиц серопозитивных к антителам токсоплазм достоверно чаще регистрируются больные с верифицированным диагнозом «шизофрения».
3. Впервые в Российской Федерации показано, что помимо шизофрении у лиц с хроническим токсоплазмозом статистически значимо чаще выявляли лиц с девиантным поведением.

Практическая ценность работы:

Определены параметры комплексной диагностики хронического латентного токсоплазмоза с использованием нескольких иммунологических методов – ИФА (иммуноферментного анализа) и РНИФ (реакции непрямой иммунофлюоресценции).

Обоснована нецелесообразность использования ПЦР (полимеразной цепной реакции) для диагностики латентного хронического токсоплазмоза.

Внедрение материалов исследований в практику:

1. Материалы диссертации включены в Методические указания МУК 4.2.3533—18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней».
2. Материалы исследований используются в виде лекций, семинарских и практических занятий на Кафедре тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава РФ по специальности 03.02.11 - «паразитология»;

3. Материалы исследований используются в виде лекций, семинарских и практических занятий Кафедрой тропических, паразитарных болезней и дезинфекционного дела Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава РФ по специальности 03.02.11 - «паразитология».

Апробация результатов исследования.

Основные положения диссертации были доложены на:

- II Российском конгрессе лабораторной медицины, Москва, 12-14 октября 2016 года
- IX Ежегодном всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 27-29 марта 2017 года; III Российском конгрессе лабораторной медицины, Москва, 11-13 октября 2017 года
- X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 26-28 февраля 2018 г.
- IV Российском конгрессе лабораторной медицины, Москва, 03-05 октября 2018 года
- V Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием "Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания", Сочи, 30 октября-02 ноября 2018 г.

Диссертация апробирована на совместном заседании Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им.Е.И.Марциновского и кафедры тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 1 от 18 апреля 2019 года).

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации.

Автор самостоятельно проанализировала литературные данные, обеспечила сбор, транспортировку и исследование биологического материала молекулярно-биологическими и иммунологическими методами. Провела анализ результатов выполненных исследований и статистическую обработку полученных данных.

Степановой Е.В. сформулированы практические рекомендации по диагностике токсоплазмоза. Материалы диссертации включены в Методические указания МУК 4.2.3533—18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Задачи и научные положения, выносимые на защиту, диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.11 «Паразитология». Результаты проведенного исследования

соответствуют области исследования паспорта специальности 03.02.11 «Паразитология», конкретно пунктам 8, 9.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 105 публикаций, в том числе 68 иностранных. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 9 рисунками.

Публикации.

По материалам исследований опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК России и Scopus, в том числе одна в зарубежном журнале. Материалы диссертации вошли в Методические указания Федерального уровня.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за помощь в проведении исследований: сотрудникам лаборатории Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В.Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы; сотрудникам Клиники психиатрии им. С.С.Корсакова ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России; сотрудникам КДЛ и КДЦ Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы:

Исследования выполняли в Институте медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), на базе клиники психиатрии им. С.С. Корсакова Сеченовского Университета и Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Дизайн исследования был одобрен на заседании Межвузовского Комитета по Этике № 04-13 от 10.04.2013 г.

Группы обследования:

1. Пациенты, пострадавшие от ДТП и проходящие лечение в стационаре клинического отделения Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
2. Больные с верифицированным диагнозом шизофрения (F 20 по МКБ), проходящие лечение в клинике психиатрии им. С.С. Корсакова Сеченовского Университета.

3. Практически здоровые люди, направленные на диспансеризацию в Клинический центр Сеченовского Университета.

Кроме того, анализировались многолетние данные по ИФА диагностике токсоплазмоза пациентов, проходящих диагностику в КДЛ Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского Сеченовского Университета.

Для анализа методом иммуноферментной диагностики, проводимой в КДЛ Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского Сеченовского Университета, было использовано из банка сывороток 5225 образцов сыворотки от пациентов с подозрением на заболевания паразитарной этиологии.

В ходе исследования эффективности молекулярно-биологических и иммунологических методов диагностики токсоплазмоза были использованы музейные образцы сывороток. Нами были сформированы две группы: опытная и контрольная. В опытную группу входили 100 сывороток от пациентов с наличием иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii*. Контрольную группу составили 100 сывороток от практически здоровых лиц с отрицательным результатом ИФА к токсоплазменным иммуноглобулинам класса G. Материалом для ПЦР исследования служила кровь, сыворотка которой предварительно была протестирована на наличие иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii* согласно протоколам производителя «Вектор Токсо-IgG» ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ».

Для сравнительной оценки иммунологических методов диагностики токсоплазмоза использовали 110 образцов из банка сывороток. Образцы одновременно исследовали с помощью двух тест систем (РНИФ и ИФА) производителя ЗАО «ЭКОлаб». Сыворотки были собраны от пациентов клинического отделения Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, направленных для диагностики на паразитозы.

Для определения частоты инфицирования *Toxoplasma gondii* в группе лиц, попавших в дорожно-транспортное происшествие (ДТП) по сравнению с практически здоровыми людьми было проведено аналитическое эпидемиологическое исследование ранга «случай-контроль», представленное двумя группами: опытной и контрольной.

В опытную группу входили лица, имеющие право на вождение личного транспорта, госпитализированные по причине дорожно-транспортного происшествия, виновниками которого они являлись, в Научно – исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Критериями включения в опытную группу были: нахождение пострадавшего за рулем в момент ДТП с тяжелыми последствиями; возраст от 18 до 45 лет. Критерием исключения из опытной

группы было нахождение пострадавшего в момент ДТП в состоянии алкогольного или наркотического опьянения и присутствие сопутствующей инфекционной патологии (гепатит, СПИД). Всего в опытную группу было включено 100 человек – 65 мужчин и 35 женщин.

Контрольная группа была сформирована из числа условно-здоровых пациентов в возрасте 18-45 лет, проходивших плановую диспансеризацию в Клиническом центре Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Эта группа составила 152 человека (82 мужчины и 70 женщин).

Для определения частоты инфицирования *Toxoplasma gondii* в группе пациентов с верифицированным диагнозом шизофрении (F 20 по МКБ), нами был выбран метод аналитического эпидемиологического исследования типа «случай-контроль», представленного двумя группами.

В первую группу входили пациенты клиники психиатрии им. С.С. Корсакова Сеченовского Университета. Критериями включения в первую группу были: диагноз F 20; возраст от 18 до 45 лет. Критерием исключения из группы было присутствие сопутствующей инфекционной патологии (гепатит, СПИД). Всего в первую группу было включено 155 человек – 75 мужчин и 80 женщин.

Вторая группа взята из числа условно-здоровых пациентов в возрасте 18-45 лет, проходивших плановую диспансеризацию в Клиническом центре Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Эта группа составила 152 человека (82 мужчины и 70 женщин).

Объем исследований составил 5942 пробы сыворотки крови людей, вошедших в группы обследования. Для исследования были использованы остатки сыворотки больных, которые были взяты в стационаре для необходимых клинических лабораторных исследований.

Методы исследований

1. Аналитическое сероэпидемиологическое исследование ранга «случай-контроль»;
2. Серологические методы: ИФА и РНИФ;
3. Молекулярно-биологический метод: ПЦР;
4. Статистические методы: определение критерия χ^2 , корреляционный анализ, многомерный статистический анализ.

Нами были использованы методы ИФА и РНИФ для выявления антител. Для выявления ДНК *T. gondii* был использован метод ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИЦ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛАТЕНТНЫМ ТОКСОПЛАЗМОЗОМ

Анализ базовых многолетних данных по иммуноферментной диагностике токсоплазмоза.

Сведения о распространении серологических маркеров инфицирования *T. gondii* среди населения РФ являются важным индикатором для оценки эпидемической ситуации по данной патологии. Настоящее исследование проводилось с целью изучения частоты обнаружения антител класса G к *T. gondii* у людей различного возраста, проживающих в Московском регионе и проходивших диспансеризацию в Клиническом центре Сеченовского Университета.

В данном разделе приведены результаты по иммуноферментной диагностике токсоплазмоза, выполненной в лаборатории Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского Сеченовского Университета. Проведенный нами анализ фона показал, что за период с 2014 по 2018 гг. было обследовано на токсоплазмоз 5225 человек (Таблица 1). Все обследуемые поступали по направлению врачей -паразитологов и других специалистов с подозрением на паразитарную инвазию. Все образцы крови были исследованы на наличие иммуноглобулинов класса М (IgM). Присутствие антител данного класса не было выявлено ни в одном из исследуемых образцов.

Таблица 1. Анализ базовых многолетних данных по иммуноферментной диагностике токсоплазмоза

группы \ год	2018	2017	2016	2015	2014	За 2014-2018
Всего обследовано на токсоплазмоз	924	1205	1044	1015	1037	5225
Положительные на Тохо IgG	227	291	261	264	269	1312
Процент положительных	24.57%	24.00%	25.00%	26.00%	25.90%	25.09%
10-40 МЕ/мл	4	15	18	12	19	68
41-80 МЕ/мл	35	21	22	22	27	127
81-120 МЕ/мл	33	41	28	33	26	161
121-200 МЕ/мл	155	214	193	197	197	956

Количественное определение иммуноглобулинов класса G к антигенам *T. gondii* проводилось в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). Диапазон измеряемых концентраций 10-200 МЕ/мл. Если концентрация Тохо-IgG в анализируемом образце менее 10 МЕ/мл, результат оценивался как отрицательный. Если концентрация Тохо-IgG в анализируемом образце более 10 МЕ/мл, результат оценивали как положительный.

Среди 5225 обследованных образцов только 1312 содержали антитела класса IgG к антигенам токсоплазм. Нами был проведен анализ положительных образцов по содержанию иммуноглобулинов класса G в международных единицах на миллилитр. Из 1312 положительных по Тохо-IgG 68 образцов находились в диапазоне от 10 до 40 МЕ/мл. Такие образцы надлежит исследовать в динамике. Концентрация Тохо-IgG от 10 до 40 МЕ/мл не обеспечивает невосприимчивости к *Toxoplasma gondii* при реинфекции.

127 образцов находились в диапазоне от 41 до 80 МЕ/мл. 161 образцов находились в диапазоне от 81 до 120 МЕ/мл. Наибольшее число образцов – 956 – находились в диапазоне от 121 до 200 МЕ/мл. Такие показатели свидетельствуют о наличии латентной инфекции. Таким образом, в нашей группе большинство обследуемых имели латентный хронический токсоплазмоз. Из таблицы 3.1.1 следует, что на протяжении пяти лет процент положительных по антигенам к *T. gondii* оставался в пределах 25%.

По статистическим данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, опубликованным в официальном письме «О ситуации по токсоплазмозу в Российской Федерации» от 16 декабря 2016 года N 01/16835-16-27, доля серопозитивных сывороток к *T. gondii* составила 31%. Наиболее высокая частота обнаружения лиц, серопозитивных к *T. gondii*, отмечается в 17 субъектах Российской Федерации: республиках Дагестан, Карелия, Белгородской, Брянской, Вологодской, Ивановской, Калужской, Липецкой, Московской, Тамбовской, Томской, Тульской, Сахалинской, Саратовской, Свердловской, Смоленской областях, городе Москва.

Результаты проведенных нами исследований по изучению распространения серологических маркеров инфицированности пациентов Клинического центра Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского Сеченовского Университета также свидетельствуют о наличии высокого уровня инвазированности населения Московского региона токсоплазмами.

Полученные нами данные согласуются с данными других эпидемиологических исследований. В мире пораженность паразита, варьирует от 1% до 100% в зависимости от условий окружающей среды и социально-экономических условий, включая пищевые привычки и связанные со здоровьем практики, общий уровень гигиены, восприимчивость хозяина,

географическое положение (географическая широта) и влажность почвы. Заболеваемость повышается в теплых и влажных климатических условиях и увеличивается с возрастом. Увеличение инвазированности *T.gondii* с возрастом связано с тем, что однажды заразившись, человек становится пожизненным носителем и, таким образом, в старших возрастах доля инфицированных накапливается. В большинстве человеческих популяций пораженность паразитов не только увеличивается с возрастом, но и может варьировать в зависимости от пола. Широтная изменчивость пораженности паразита может быть связана с местными условиями выпадения осадков (ооцисты сохраняются во влажных условиях), а также с областями низкой высоты, особенно в средних широтах; градиент пораженности между севером и югом обнаружен не только у людей, но и среди животных.

Пораженность токсоплазмозом высока у иммунокомпрометированных пациентов, таких как инфицированные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), а также у пациентов после трансплантации органов или с онкопатологией, получавших иммунодепрессанты.

Различные серологические методы, используемые для получения данных о распространенности, не стандартизированы и различаются по чувствительности, специфичности и прогностическим значениям.

В литературе большинство данных о пораженности токсоплазмозом доступны только для женщин детородного возраста, что связано с обязательным обследованием этой категории на токсоплазмоз при беременности.

ПЦР диагностика токсоплазмоза

В настоящее время в Российской Федерации выпускаются несколько коммерческих тест-систем для ПЦР-диагностики токсоплазмоза человека.

В данном исследовании представлены результаты сравнительного изучения двух коммерческих тест-систем, основанных на применении различных методов (иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции) для диагностики хронического токсоплазмоза.

Показателем латентного хронического токсоплазмоза служит сочетание позитивного результата ИФА на IgG и отрицательного на IgM.

Как видно из таблицы 2, все образцы крови как контрольной, так и опытной групп при исследовании методом ПЦР показали отрицательный результат. В соответствии с жизненным циклом токсоплазмы, при латентном хроническом токсоплазмозе паразит в периферической крови отсутствует, что и определяет отсутствие положительных ПЦР реакций ввиду отсутствия ДНК. Проведённые исследования доказывают нецелесообразность использования ПЦР для диагностики латентного хронического токсоплазмоза.

Таблица 2. Сравнительные результаты качественного исследования образцов сыворотки в ИФА и крови в ПЦР

Количество образцов	Результаты					
	ПЦР		ИФА			
	+	-	+	-	+	-
			IgG	IgG	IgM	IgM
100	0	100	100	0	0	100
100 (контроль)	0	100	0	100	0	100

Сравнительная характеристика иммунологических методов диагностики токсоплазмоза

Данные литературы свидетельствуют о том, что в настоящее время для лабораторной диагностики токсоплазмоза чаще всего применяют серологические методы: реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА). Однако оба метода обладают разной чувствительностью и специфичностью. Проанализировав вопрос о повышении эффективности иммунодиагностических (серологических) методов при хроническом токсоплазмозе мы полагаем, что одним из путей, по которому следует идти для решения данной проблемы, является одновременное использование нескольких реакций, дополняющих и корригирующих друг друга. В связи с этим мы поставили перед собой задачу изучить возможность повышения надежности иммунологической диагностики хронического токсоплазмоза путем использования двух методов: РНИФ и ИФА.

Для сравнительной оценки иммунологических методов диагностики токсоплазмоза (определение иммуноглобулинов G к *T.gondii*) использовали 76 положительных и 34 отрицательных сыворотки полученных при исследовании с помощью ИФА. Для удобства оценки интенсивности свечения (ИС) в РНИФ мы разработали методику оценки результата, приведенную в таблице 3.

Результаты исследования сывороток в ИФА и РНИФ представлены в таблице 4. Чтобы оценить информативность и разрешающую способность диагностического метода РНИФ мы определили его чувствительность, специфичность и точность. За «золотой» стандарт диагностического теста мы приняли ИФА. Чувствительность определялась как доля пациентов, действительно имеющих заболевание среди тех, у кого тест был положительным, и она составила 97 %. Специфичность определяли как долю людей, не имеющих заболевания среди всех, у кого

тест оказался отрицательным, она была равна 94 %. Точность показывает долю «правильных срабатываний теста» среди всех обследованных и является совокупным показателем информативности теста, она составила 96 %.

Таблица 3. Оценка интенсивности свечения в РНИФ

Интенсивность свечения в соответствии с инструкцией по применению	Интегральная оценка интенсивности свечения
(4+) – максимально яркое (сверкающее) желто-зеленое свечение;	4
(3+) – яркое желто-зеленое свечение;	3
(2+) – менее яркое желто-зеленое свечение;	2
(1+) – ясно различимое, но слабое желто-зеленое свечение;	1
(+) – очень слабое (тусклое) желто-зеленое свечение;	0.5
(-) – едва различимое свечение или его полное отсутствие.	-1

Таблица 4. Сравнительные результаты качественного исследования образцов сыворотки в ИФА и РНИФ

ЧИСЛО ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	РЕЗУЛЬТАТЫ ИФА		РЕЗУЛЬТАТЫ РНИФ	РЕЗУЛЬТАТЫ
110	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ	76	74	ИСТИНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ
			2	ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ
	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ	34	2	ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ
			32	ИСТИНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ

Исходя из значений чувствительности и специфичности, мы построили характеристическую кривую (ROC-кривая; англ. **R**eceiver **O**perating **C**haracteristic (ROC) curve), (Рисунок 1) которая показывает зависимость числа верно диагностированных положительных случаев от числа неверно диагностированных отрицательных случаев (ось X=специфичность, ось Y=чувствительность).

По нашему графику можно сделать вывод, что РНИФ по своей специфичности и чувствительности не уступает ИФА. Однако данная методика подразумевает субъективную оценку показателей и зависит от квалификации исследователя, в частности специалиста в области клинической лабораторной диагностики.

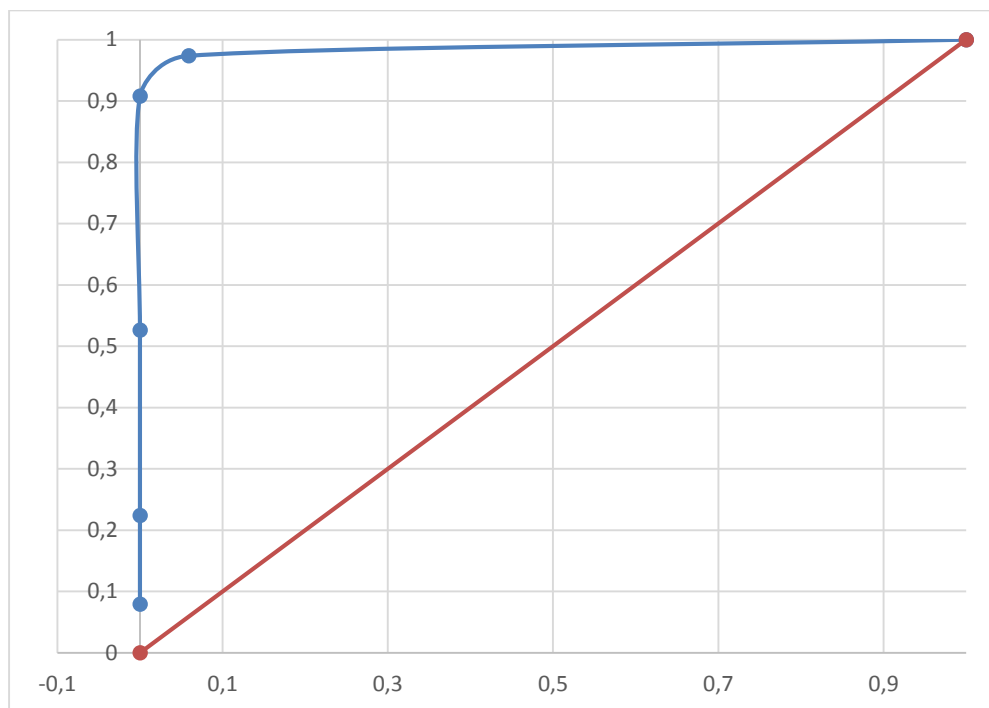


Рисунок 1. Характеристическая ROC-кривая для РНИФ.

Для оценки тесноты, или силы, корреляционной связи между двумя методами РНИФ и ИФА был определен коэффициент корреляции Пирсона.

Значение коэффициента корреляции Пирсона составило 0.865, что соответствует высокой тесноте связи между ИФА и РНИФ. Силу корреляционной связи оценивали по таблице Чеддока (Таблица 5).

Таблица 5. Таблица Чеддока

Абсолютное значение R	Теснота (сила) корреляционной связи
менее 0.3	слабая
от 0.3 до 0.5	умеренная
от 0.5 до 0.7	заметная
от 0.7 до 0.9	высокая
более 0.9	весьма высокая

Оценка статистической значимости коэффициента корреляции r_{xy} осуществляется при помощи t-критерия.

Как видно из рисунка 2 корреляция между значениями оптической плотности (ОП) и интенсивностью свечения (ИС) положительная, так как большие значения интенсивности свечения имеют тенденцию к ассоциации с большими значениями оптической плотности. Для оценки насколько сильно линейно связаны эти две переменные ОП и ИС был рассчитан коэффициент детерминации R^2 , который представляет собой квадрат коэффициента корреляции Пирсона $R^2 = 0.865^2$. Коэффициент детерминации R^2 заключен в пределах от 0 до 1, то есть должен быть $0 \leq R^2 \leq 1$. По нашим подсчетам коэффициент детерминации составил **0.7484**, следовательно, мы можем говорить о строгом линейном соотношении (линейной функции) между переменными ОП и ИС.

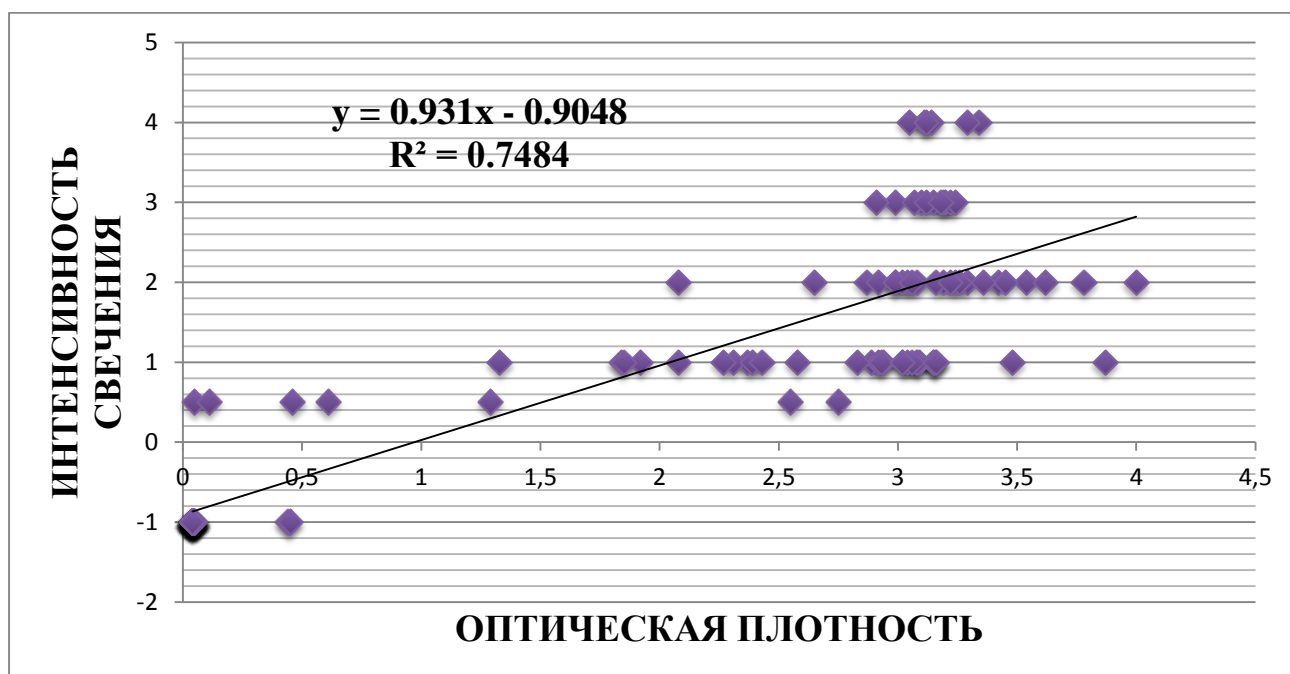


Рисунок 2. Зависимость интенсивности свечения в РНИФ от оптической плотности в ИФА.

Мы проанализировали зависимость интенсивности свечения в РНИФ от оптической плотности в ИФА. Для этого мы взяли все положительные результаты 76 и распределили их по показателю интенсивности свечения (Таблица 6).

Как видно из таблицы 6, максимальное число образцов (29 из 76 положительных) пришлось на ИС с значением 1. Однако разброс по оптической плотности был весьма большой – от 1.33 до 3.87, что указывает на отсутствие какой-либо зависимости ИС от ОП. Значение ИС 0.5 соответствует очень слабому (тусклому) свечению. Из 7 исследуемых образцов 3 были с

значениями ОП 1.29, 2.55, 2.75, два образца имели оптическую плотность 0.46 и 0.61. 2 образца были ложноположительными с значениями ОП 0.05 и 0.11. Следовательно, можно сделать вывод об отсутствии связи интенсивности свечения от оптической плотности. РНИФ может использоваться для диагностики латентного хронического токсоплазмоза в качественном анализе, как дополнительная подтверждающая методика.

Таблица 6. Распределение положительных результатов в ИФА по интенсивности свечения в РНИФ

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВЕЧЕНИЯ ПО РНИФ	ЧИСЛО ОБРАЗЦОВ	РАЗБРОС ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ПО ИФА
4	6	3.05 – 3.34
3	11	2.91 – 3.24
2	23	2.08 – 4
1	29	1.33 – 3.87
0.5	7	0.05 – 2.75

Диагностическая эффективность набора при исследовании сывороток методом РНИФ была сопоставима с результатами ИФА. Качественные оценки исследованных образцов в ИФА и РНИФ практически совпали. При этом следует отметить, что в образцах, по которым были получены несовпадающие результаты, содержание антител находилось в зоне минимальных значений.

Таким образом, сравнительное изучение различных тест-систем для диагностики токсоплазмоза методами ИФА и РНИФ показали целесообразность использования обоих методов для диагностики токсоплазмоза. При этом РНИФ имеет значение для качественного, а ИФА – для количественного анализа.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

Результаты исследований позволили сформулировать и обосновать два основных положения научной работы.

ПОЛОЖЕНИЕ ПЕРВОЕ. Установлено, что возбудитель токсоплазмоза способен модулировать поведение человека, что выражается в повышенном риске провоцирования дорожно-транспортных происшествий.

Эпидемиологическое исследование типа случай-контроль у лиц, попавших в дорожно-транспортное происшествие

В нашей стране впервые, в Научно-исследовательском институте медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского совместно с Научно – исследовательским институтом скорой помощи им. Н.В. Склифосовского проведено сероэпидемиологическое исследование типа «случай контроль», с целью определения частоты инфицирования возбудителем *Toxoplasma gondii* в группе лиц, ставших виновниками ДТП, по сравнению с таковой у практически здоровых людей (Рисунок 3). По данным МВД России в стране ежегодно происходит более 121 тысячи ДТП, в которых погибло от 13 до 15 тысяч человек, 155 тысяч человек являются пострадавшими с разной степенью тяжести.

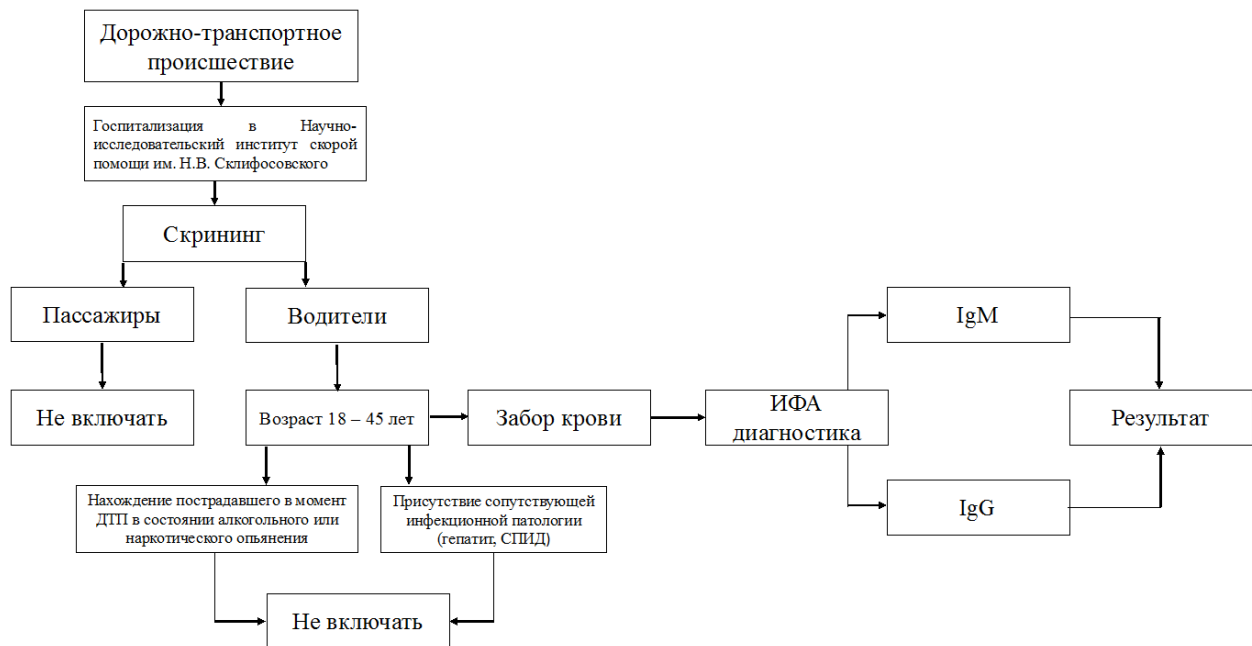


Рисунок 3. Схема дизайна исследования

Для изучения данной проблемы определяли долю серопозитивных к антигенам

токсоплазм среди пострадавших виновников ДТП, госпитализированных с травмами разного генеза в Научно – исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Из анализа исключали лиц, находившихся в алкогольном и наркотическом опьянении, а также больных с тяжелыми сопутствующими заболеваниями, способными спровоцировать ДТП.

Таблица 7. Результаты обследования на выявление иммуноглобулинов класса IgM и IgG к *Toxoplasma gondii* в опытной и контрольной группах

Группы	Обследуемые	Абсолютное число		Положительные результаты (%)	Отношение шансов	Доверительный интервал	p-values (статистический показатель)
		IgM	IgG				
Опыт	100	0	45	45%	2.37	1.34-4.2	0.001
Контроль	152	0	39	25%			

Как показывают данные, приведенные в таблице 7, при постановке ИФА на определение иммуноглобулинов класса IgM к *Toxoplasma gondii* в обеих группах результаты были отрицательные. В тоже время в опытной группе в 45% случаев обнаружены иммуноглобулины G к *Toxoplasma gondii*. Аналогичная картина была и в контрольной группе: у 39 из 152 человек найдены иммуноглобулины G к *Toxoplasma gondii*, что составляет 25%. Отрицательные результаты на выявление иммуноглобулинов IgM, в совокупности с положительными данными на IgG, свидетельствуют, что у всех – и опытной, и контрольной групп – обнаружена только латентная форма хронического токсоплазмоза. Однако, как видно из полученных нами результатов, в опытной группе доля серопозитивных лиц на иммуноглобулины IgG значительно превышала таковую в контрольной группе. Таким образом, среди людей, спровоцировавших ДТП, латентный хронический токсоплазмоз распространен статистически достоверно больше, чем в исследуемой нами контрольной группе, характеризующей генеральную выборку из популяции. Это указывает на тот факт, что существует причинно-следственная связь между хроническим латентным токсоплазмозом и увеличением риска провоцирования ДТП.

ПОЛОЖЕНИЕ ВТОРОЕ. В группе больных хроническим латентным токсоплазмозом достоверно чаще выявляются лица с диагнозом шизофрения и некоторыми другими видами девиантного поведения.

Эпидемиологическое исследование типа случай-контроль у лиц, страдающих шизофренией

В СССР были опубликованы работы, указывающие на связь токсоплазмоза и расстройств центральной нервной системы, включая шизофрению. Многочисленные наблюдения, проведённые в различных зарубежных странах на тысячах больных с психическими заболеваниями, подтвердили выводы советских психиатров. В последние тридцать лет подобные исследования в Российской Федерации не проводились. Необходимость проведения дополнительных исследований диктуется достаточно острой проблемой шизофрении в современной России. Согласно официальной статистике, в России шизофренией страдают около 550 000 человек, из них 14% больных не попадают в поле зрения психиатров. Более 60% больных психическими расстройствами трудоспособного возраста являются инвалидами. Безработица среди таких больных превышает таковую в общей популяции населения на порядок. Бремя болезни влияет на экономику страны. Наши исследования проводились в комплексе с высококвалифицированными специалистами клиники психиатрии им. С.С. Корсакова Сеченовского Университета. В опытную группу были включены только больные с верифицированным диагнозом шизофрения (F 20 по МКБ). Критерием исключения из группы было присутствие сопутствующей инфекционной патологии (гепатит, СПИД) (Рисунок 4).

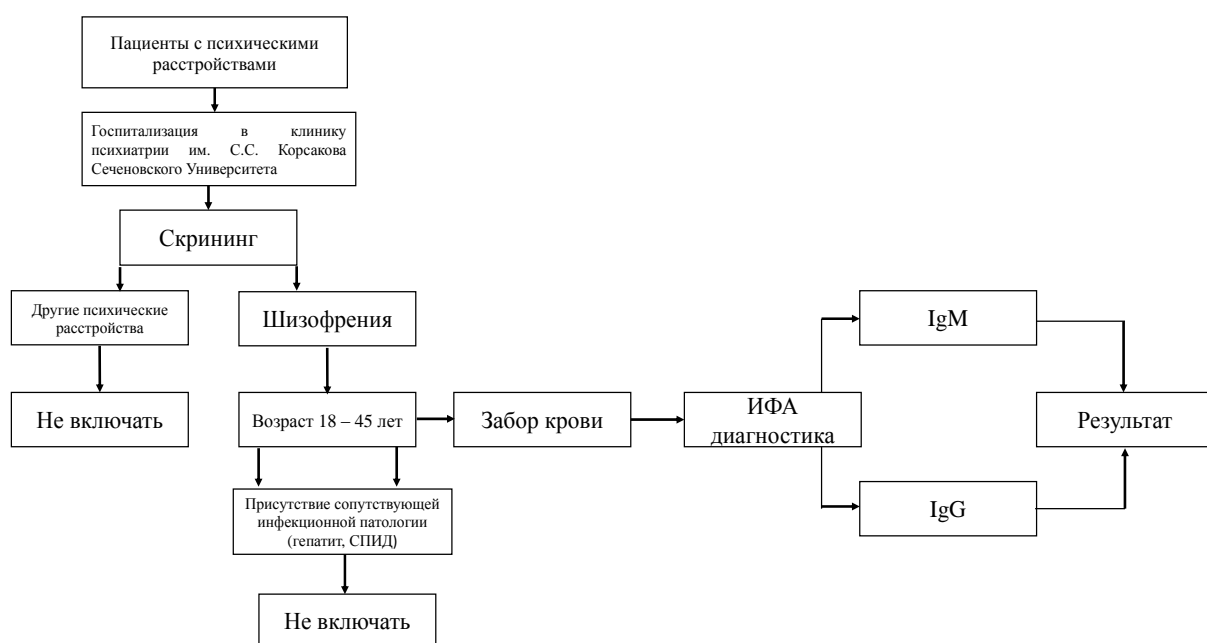


Рисунок 4. Схема дизайна исследования

Таблица 8. Результаты обследования на выявление иммуноглобулинов класса IgM и IgG к *Toxoplasma gondii* в опытной и контрольной группах

Группы	Обследуемые	Абсолютное число		Положительные результаты (%)	Отношение шансов	Доверительный интервал	p-values (статистический показатель)
		IgM	IgG				
Опыт	155	0	62	40%	1.93	1.16-3.23	0.007
Контроль	152	0	39	25%			

Результаты исследования сывороток крови опытных и контрольных групп представлены в таблице 8. Как показывают данные, приведенные в таблице, при постановке ИФА на определение иммуноглобулинов к *Toxoplasma gondii* у всех – и опытной, и контрольной групп была выявлена только хроническая форма токсоплазмоза.

Как видно из полученных нами результатов в таблице 8, в опытной группе число серопозитивных лиц на иммуноглобулины IgG достоверно превышало таковых в контрольной группе. Таким образом, среди пациентов с верифицированным диагнозом шизофрения (F 20 по МКБ), доля больных с латентным хроническим токсоплазмозом была статистически достоверно выше, чем во взятой нами контрольной группе. Четкая ассоциация между хроническим латентным токсоплазмозом и шизофренией существует как для всей группы больных шизофренией, так и для групп больных, дифференцированных по полу.

Возможная ассоциация хронического латентного токсоплазмоза с отклонениями в поведении (на основе клинических наблюдений).

Наряду с верифицированным диагнозом шизофрения некоторые исследователи выявляли ассоциацию хронического латентного токсоплазмоза с другими проявлениями расстройства

психики. Наиболее часто подобная ассоциация наблюдалась с возникновением различных «фобий» и агрессивностью поведения. С целью обнаружения изменений в психическом состоянии у пациентов с хроническим латентным токсоплазмозом нами был проведен ретроспективный анализ медицинской документации больных, обследовавшихся нами на наличие антител к антигенам токсоплазм.

У всех пациентов из описанных 7 клинических случаев имелось расстройство психики (депрессивное состояние, панические атаки) в сочетании с хроническим латентным токсоплазмозом.

Наши единичные наблюдения совпадают с данными других исследователей, которые также выявляли наличие ассоциации хронического токсоплазмоза не только с шизофренией, но и с другой психиатрической патологией и дополняют выявленную тенденцию. Как показано разными авторами, включая наши исследования, хроническая токсоплазменная инфекция может, помимо шизофрении, провоцировать и другие виды девиантного поведения у больных, и, в частности повышенную раздражительность и агрессию.

ВЫВОДЫ

1. Для лабораторной диагностики хронического латентного токсоплазмоза целесообразно использовать ИФА и РНИФ. Однако по экономическим критериям ИФА предпочтительней.
2. Доказано наличие достоверной ассоциации латентного хронического токсоплазмоза с повышенным риском инициирования ДТП у лиц с положительными IgG к антигенам токсоплазм. Доля виновников ДТП с верифицированным диагнозом латентный хронический токсоплазмоз в 2,37 раза выше, чем у лиц с отсутствием токсоплазменной инфекции.
3. Водители транспортных средств с латентным хроническим токсоплазмозом должны дополнительно предупреждаться о существовании у них повышенного риска явиться виновником ДТП.
4. Заражение *Toxoplasma gondii* с высокой вероятностью ассоциируется с развитием шизофрении. Среди больных с верифицированным диагнозом шизофрения (F20 по МКБ) в 1,93 раза чаще выявляются лица с латентным хроническим токсоплазмозом, чем неинфицированные.
5. У лиц с латентным хроническим токсоплазмозом помимо шизофрении могут появляться другие психоневрологические отклонения в поведении больных, в частности агрессивность, раздражительность и различные фобии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Сравнительное изучение различных тест-систем для диагностики токсоплазмоза методами ИФА и РНИФ показали целесообразность использования этих методов в комплексе, что позволяет повысить точность дифференциальной диагностики токсоплазмоза. При этом РНИФ имеет значение для качественного, а ИФА – для количественного анализа.

ПЦР не может быть рекомендован для скрининга инфицированных токсоплазмами практически здоровых лиц, в том числе беременных женщин, так как этот метод не позволяет выявить больных хроническим латентным токсоплазмозом.

2. Для эпидемиологических обследований и скрининговых исследований на наличие хронического латентного токсоплазмоза целесообразно использовать тест-системы ИФА.

3. Группы высокого риска инфицирования токсоплазмами включают: пациентов с психическими заболеваниями и лиц, виновных в возникновении ДТП. Серологический мониторинг за этими группами повышает выявляемость хронического латентного токсоплазмоза и, в дальнейшем, позволяет усилить проведение профилактических мероприятий.

4. Помимо шизофрении можно рекомендовать дополнительное обследование на хронический латентный токсоплазмоз лиц с девиантным поведением (панические атаки, депрессия, фобии).

5. Водители автотранспортных средств с латентным хроническим токсоплазмозом должны быть информированы о наличии у них повышенного риска стать участником ДТП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Степанова, Е.В.** Латентный хронический токсоплазмоз и шизофрения [Текст] / **Е.В. Степанова**, А.В. Кондрашин, М.С. Максимова, Н.А. Турбабина, Л.Ф. Морозова, Е.Н. Морозов, М.А. Кинкулькина, А.В. Лазарева, А.Ю. Бражников, В.П. Сергиев // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни.** – 2019. – № 1.– С.18-24.
2. **Степанова, Е.В.** Особенности диагностики хронического токсоплазмоза [Текст] / **Е.В. Степанова**, М.С. Максимова, Н.А. Турбабина, Л.Ф. Морозова, А.В. Кондрашин, В.П. Сергиев, Е.Н. Морозов // **Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.** – 2018. – Т. 7.– № 4. – С. 85-89.
3. **Степанова, Е.В.** Предполагаемые последствия направленной модуляции поведения человека под воздействием *Toxoplasma gondii* [Текст] / **Е.В. Степанова**, А.В. Кондрашин, М.А. Годков, А.И. Баженов, А.Ю. Бражников, В.П. Сергиев // **Медицинская паразитология и паразитарные болезни.** – 2015. – № 3.– С. 8-12.
4. **Stepanova, E.V.** Significance of chronic toxoplasmosis in epidemiology of road traffic accidents in Russian Federation [Electronic resource] / **E.V. Stepanova**, A.V. Kondrashin, V.P. Sergiev, L.F. Morozova, N.A.Turbabina, M.S. Maksimova, A.I. Brazhnikov, S.B. Shevchenko, E.N. Morozov // **PLoS One.** – 2017. – Vol.12: Режим доступа: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184930>