

Заключение

1. У пациентов с первичным иммунодефицитом по IgA и IgG повышена, по сравнению со здоровыми лицами, способность нейтрофилов крови к формированию экстрацеллюлярных сетей (нетоз).

2. Изменения нетоза выявляются только в культурах клеток, инкубированных в течение 150 мин, что доказывает участие НАДФН-зависимых механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar, Y. Common variable immunodeficiency in adults: current diagnostic protocol and laboratory measures / Y. Kumar, A. Bhatia // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* — 2013. — Vol. 9, № 10. — P. 959–977.
2. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б. Г. Андрюков [и др.] // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2017. — № 1(68). — С. 4–18.
3. Bryan, G. NETosis: how vital is it? / G. Bryan // *Blood.* — 2013. — Vol. 122(16). — P. 2784–2794.
4. Долгушин, И. И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // *Аллергология и иммунология.* — 2009. — № 10(3). — С. 458–462.
5. Гусакова, Н. В. Функциональный статус нейтрофилов у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями различной этиологии / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2016. — № 4(50). — С. 48–53.

УДК 578.891:577.21

ВЫЯВЛЕНИЕ ТТ-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

**Осипкина О. В.¹, Воропаев Е. В.¹, Мицура В. М.¹,
Зятков А. А.¹, Терешков Д. В.²**

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Учреждение здравоохранения

«Гомельская областная инфекционная клиническая больница»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

TTV (transfusion-transmitted virus — вирус, передающийся при трансфузии крови, *Torque teno virus*) был открыт в 1997 г. у пациента с посттрансфузионным гепатитом неизвестной этиологии. В дальнейшем была установлена широкая распространенность TTV в разных группах населения во многих регионах мира и гетерогенность геномной структуры. В настоящее время согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) [1] описаны 29 видов TTV (род *Alphatorquevirus* семейства *Anelloviridae*). Кроме того, в состав данного семейства включены 12 видов *Torque Teno mini virus* — TTMV (род *Betatorquevirus*) и 15 видов *Torque teno midi virus* — TTMDV (род *Gammatorquevirus*) геномы которых, несмотря на отличия, сохраняют значительное сходство с TTV. В связи с гепатотропностью вируса представляет интерес выявление ТТ-вирусной инфекции у пациентов с острыми и хроническими заболеваниями печени, а также оценка частоты распространенности ТТ-вирусной инфекции в разных группах населения.

Цель

Выявление ТТ-вирусной инфекции у пациентов, с острыми и хроническими заболеваниями печени, инфицированные вирусами гепатита В и С, и доноров, имеющих отрицательные результаты обследования на маркеры вирусных гепатитов; оценка частоты распространенности ТТ-вирусной инфекции в исследуемых группах.

Материал и методы исследования

Исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории Учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет». В исследовании были задействованы пациенты с острыми и хроническими заболеваниями

печени, инфицированные и вирусами гепатита В (HBV) и С (HCV) (учреждение «Гомельская областная инфекционная клиническая больница», N = 119) и безвозмездные доноры Гомельской станции переливания крови, имеющие отрицательные результаты обследования на маркеры вирусных гепатитов (N = 125). Пациенты являлись жителями Гомеля или Гомельской области, у всех было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Выявление ТТ-вирусной инфекции включает выделение ДНК, nested-ПЦР (полимеразная цепная реакция в «гнездовом» формате) и электрофоретическую детекцию. К преимуществам nested-ПЦР относят высокую чувствительность и уменьшение числа побочных продуктов реакции. В качестве материала для исследования использовали ДНК, выделенную из плазмы крови пациентов. Для проведения выделения ДНК, ПЦР, электрофоретической детекции и секвенирования использованы готовые коммерческие реагенты согласно инструкции производителя.

Подтверждение соответствия амплифицированных фрагментов геномам вирусов ТТВ, ТТМВ и ТТМДВ проводили методом секвенирования по Сэнжеру. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного пакета Sequencing Analysis Software 5.1.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Образцы, в которых наличие ДНК вируса ТТВ установлено методом секвенирования, использовали в качестве положительного контроля (К+). Отсутствие ПЦР-реакции в положительном образце указывало на некорректность при составлении ПЦР-смеси или программы амплификации. Отрицательный контрольный образец (К-) представлял собой дистиллированную воду и был предназначен для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие амплификации в данной пробирке указывало на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК. Положительный и отрицательный контрольные образцы наряду с образцами экспериментальной и контрольной групп использовали при каждой постановке ПЦР.

В данном исследовании были использованы праймеры, комплементарные консервативному региону генома ТТВ [2]. Структура праймеров для выявления ДНК вирусов ТТВ, ТТМВ и ТТМДВ для первого раунда ПЦР: NG779 — ACWKMCGAATGGCTGAGTTT; NG780 — RGTGRCGAATGGYWGAGTTT; NG781 — CCCKWGCCCGARTTGCCCCT; NG782 — YCTWGCCCCGAATTGCCCCT.

Для второго раунда ПЦР использованы ампликоны, полученные в результате первого раунда. Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТТВ: NG779, NG780, NG785 — CCCCTTGACTBCGGTGTGТАА. Наличие зоны размером 115 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов ТТВ. Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТТМВ: NG792 — TTTATGCYGCYAGACGRAGA; NG793 — TTTAYCMYGCCAGACGGAGA; NG794 — TTTATGCCGCCAGACGRAGG; NG791 — CTCACCTYSGGCWCCCCGCC. Наличие зоны размером 71 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов ТТМВ. Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТТМДВ: NG795 — SGABCGAGCGCAGCGAGGAG; NG796 — GCCCGARTTGCCCCTAGACC. наличие зоны размером 87 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов ТТМДВ.

Сравнение частот выявления ДНК ТТВ проведено с использованием критерия χ^2 Пирсона. Статистическая обработка полученной информации проводилась с помощью пакета «Microsoft Excel 2016» и программы «Statistica» 6.0. Статистически значимой считалась 95 % вероятность различий ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Частоты выявления ДНК TTV, TTMDV и TTMV и доверительный интервал (95 % ДИ) относительных частот приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Относительные частоты выявления ДНК вирусов TTV, TTMDV, TTMV в группе пациентов и доноров

ДНК вирусов	Относительная частота выявления ДНК вирусов в группе пациентов (N = 119), (95 % ДИ)	Относительная частота выявления ДНК вирусов в группе доноров (N = 125), (95 % ДИ)
TTV	89,9 % (83,1–94,3)	89,6 % (82,9–93,9)
TTMDV	76,5 % (68,1–83,2)	76 % (67,8–82,7)
TTMV	87,4 % (80,1–92,3)	84 % (76,5–89,5)
TTV + TTMDV + TTMV	72,3 % (63,6–79,6)	72 % (63,5–79,2)
Не выявлено	8,4 % (4,5–15)	10,4 % (6,1–17,1)

Частота выявления ДНК TTV в образцах плазмы в группе пациентов составила 89,9 % (95 % ДИ 83,1–94,3), ДНК TTMDV — 76,5 % (95 % ДИ 68,1–83,2), ДНК TTMV — 87,4 % (95 % ДИ 80,1–92,3), различия между группами по соответствующим частотам не являются статистически значимыми. В основной и контрольных группах наиболее часто встречаются пациенты, у которых выявлена микст-инфекция (ДНК вирусов из трех родов одновременно, комбинация TTV + TTMV + TTMDV) (95 % ДИ частоты встречаемости составляет 63,6–79,6 и 63,5–79,2, соответственно). Частота выявления ДНК хотя бы одного из указанных вирусов в группах пациентов и доноров составляет 91,6 % (95 % ДИ 85,1–95,5) и 89,6 % (71,2–85,4), соответственно, статистически значимых отличий между группами не обнаружено.

Выполнен сравнительный анализ полученных результатов с результатами исследований, описанными в литературе. В одном из экспериментов участвовали 305 практически здоровых японских испытуемых в возрасте от 1 до 81 года, имеющих отрицательные результаты обследования на маркеры вирусных гепатитов. Метод ПЦР, проведенный с использованием данных универсальных и вирусоспецифичных праймеров, выявил высокие показатели виремии: TTV — 99,2 %, TTMDV — 82,4 % и TTMV — 89,7 %, кроме того, выявлены частые двойные или тройные инфекции этих анелловирусов [1].

Подобное исследование проведено в группе 113 здоровых испытуемых (Румыния), в возрасте от 19 до 29 лет. Распространенность TTV, TTMDV и TTMV в образцах слюны составляла 71; 31 и 54 %, соответственно. Распределение TTV не отличалось в образцах крови и слюны [3].

Изучена распространенность анелловирусов у здоровых доноров и пациентов, инфицированных HBV и HCV в Катаре [4]. Исследовали образцы крови от здоровых доноров крови (N = 500) и пациентов, инфицированных HBV (N = 54) и HCV (N = 53). Показана высокая распространенность вирусов, частота выявления ДНК TTV (85,2 %) была значительно выше ($p < 0,05$), чем TTMDV и TTMV (76,3 и 66,6 %, соответственно). В отличие от проведенного нами исследования, частота выявления вирусов была значительно выше в группах пациентов, инфицированных HBV и HCV ($p < 0,05$), чем в группе здоровых доноров.

Российскими учеными проведено исследование биологического материала (сыворотки крови и биоптаты печени) 203 пациентов с хроническими заболеваниями печени и образцы сыворотки 115 доноров крови с целью изучения распространенности анелловирусов TTV, TTMDV и TTMV [5]. ДНК TTV выявлена у 96,5 % доноров, ДНК TTMDV — у 73 %, ДНК TTMV — у 89,6 %, все три анелловируса выявлены у 52,2 %, лишь у 2,6 % не выявлен ни один из них. Широкая распространенность видов *Anelloviridae* установлена и у пациентов с хроническими заболеваниями печени (более 70–90 %).

Таким образом, установлена высокая распространенность анелловирусов (TTV, TTMDV и TTMV), многие исследователи отмечают частые микст-инфекции анелловирусов в том числе и в группах доноров крови. В некоторых работах показана более высокая частота выявления вирусов в группах пациентов, инфицированных HBV и HCV.

Заключение

Апробированный метод молекулярно-генетической диагностики ТТ-вирусной инфекции подтвердил специфичность использованных праймеров и корректность использованных протоколов ПЦР. Предварительный анализ полученных данных показал, что предложенный метод молекулярно-генетического определения ТТ-вирусной инфекции может применяться у пациентов с острыми и хроническими заболеваниями печени, а также для популяционных исследований, направленных на изучение циркуляции ТТ-вирусов. Частота выявления ДНК хотя бы одного из указанных вирусов в группе пациентов с острыми и хроническими заболеваниями печени, инфицированных вирусами гепатита В и С, и доноров, имеющих отрицательные результаты обследования на маркеры вирусных гепатитов, составляет 91,6 и 89,6 %, соответственно, статистически значимых отличий между группами не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Virus Taxonomy: 2017 Release [Electronic resource]. International Committee on Taxonomy of Viruses [дата обращения: 2019 сентябрь 22]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
2. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human Anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy / M. Ninomiya [et al.] // J Clin Microbiol. — 2008. — Vol. 46(2). — P. 507–514.
3. Rapid Detection of Human Torque Teno Viruses Using High-Resolution Melting Analysis / S. Spandole [et al.] // J Med Genet. — 2013. — Vol. 16 (1). — P. 55–62.
4. Prevalence of anelloviruses (TTV, TTMDV, and TTMV) in healthy blood donors and in patients infected with HBV or HCV in Qatar / Ahmed A. Al-Qahtani [et al.] // Virology Journal. — 2016. — Vol. 13, № 208. — P. 2–6.
5. Вирусы рода anelloviridae при хронической патологии печени / И. А. Морозов [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2015. — № 7. — С. 4–11.

УДК 6.16-008.313:[616.24-008.444:616.8-009.836]

ПРЕДИКТОРЫ НАРУШЕНИЙ РИТМА СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ОБСТРУКТИВНОГО АПНОЭ СНА

Тарасик Е. С., Булгак А. Г., Затолока Н. В.

**Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр “Кардиология”»
г. Минск, Республика Беларусь**

Введение

Патология сна всегда привлекали внимание исследователей, но наибольшую актуальность проблема нарушения дыхания во время сна приобрела в последние десятилетия. По разным данным нарушения дыхания во сне чаще всего встречаются в возрасте от 50 до 70 лет, при этом частота нарушений дыхания во сне достигает 30–50 % среди пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [1].

Согласно Международной классификации расстройств сна синдром обструктивного апноэ сна (СОАС) определяется как расстройство, характеризующееся повторяющимися эпизодами обструкции верхних дыхательных путей во время сна, обычно ассоциированными с падением уровня насыщения крови кислородом. Главным проявлением синдрома является возникновение во время сна множественных эпизодов апноэ или гипопноэ — полных или неполных остановок дыхания длительностью более 10 с. Визуально эти феномены определяются по прекращению шума дыхания, которое сопровождается активными дыхательными движениями диафрагмы и вспомогательных мышц.