

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
 Ю.Л.Горбич
« 30 » _____ 2025г.
Регистрационный № 014-0525

**Метод количественного определения вирусов ТТV
в биологическом материале
инструкция по применению**

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»,
общество с ограниченной ответственностью «АртБиоТех»,
государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: О.В.Осипкина, к.м.н., доцент Е.В.Воропаев,
к.б.н. А.Н.Рымко, к.б.н. С.Т.Акалович, к.б.н., доцент А.В.Воропаева,
д.м.н., профессор В.М. Мицура, А.А.Ковалев

Гомель, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод выявления и количественной оценки ДНК вирусов TTV (*Torque Teno Virus*, *Alphatorquevirus homin*, род *Alphatorquevirus*, семейство *Anelloviridae*), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую диагностику заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся симптомами вирусной инфекции и/или иммунодефицитного состояния.

Инструкция предназначена для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей общей практики, врачей-инфекционистов, врачей-пульмонологов и иных врачей-специалистов организаций учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных условиях, условиях дневного пребывания и/или амбулаторных условиях.

1. Показания к применению

Другие вирусные болезни (B25-B34), отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D80-D89).

2. Противопоказания

Противопоказания отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения:

- холодильник, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °С;
- морозильник, поддерживающий температуру в диапазоне минус 18...минус 20 °С;
- центрифуга (максимальное ускорение – не менее 13000g);
- амплификатор (термоциклер) для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени;
- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
- штатив для вакуумных пробирок с ЭДТА для взятия крови;

- штатив «рабочее место» для микроцентрифужных пробирок объемом 0,2 мл и 1,5 мл;
- твердотельный термостат, поддерживающий диапазон температур +40...+100°C;
- термоконтейнер для транспортировки, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °C;
- микроцентрифуга-вортекс;
- аспиратор с колбой-ловушкой объемом 1 л;
- комплект пипеточных дозаторов (объемы: 0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл);
- ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 10, 20, 200, 1000 мкл;
- наконечники без фильтра для автоматического дозатора объемом 200 мкл;
- деионизированная вода;
- набор реагентов для экстракции ДНК;
- ПЦР-смесь;
- праймеры и зонды для выявления ДНК TTV в суспензии клеток (лейкоциты крови, назофарингеальные мазки): ttv-прямой-5'-cc[+g]aatg[+g][+c]tgagtt-3' ([+N] – LNA-модификация), ttv-обратный-5'-gccccttgactbcggt-3', ttv-зонд-HEX-cggcacccgcct-MGB; праймеры и зонды для выявления участка ДНК β-глобинового гена человека: β-глобин-прямой-5'-tgcacgtggatcctgagaact-3', β-глобин-обратный-5'-aattctttgccaaagtgatggg-3', β-глобин-зонд-5'-FAM-caggctcctgggcaacgtgctg-BHQ1-3';

– стандарты (калибраторы) с известным числом копий молекул ДНК TTVccgaatggctgagttttccacgcccgtccgcagcgggtgaagccacggaggagatcagcgcgtcccga gggcggggtgccggagggtgagtttacacaccgcagtcaaggggc;

– стандарты (калибраторы) с известным числом копий молекул ДНК β-глобинового гена tgcacgtggatcctgagaacttcaggctcctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggcccatcactttggcaaagaatt;

– праймеры и зонды для выявления ДНК TTV в плазме/сыворотке крови, слюне: ttv-прямой-5'-cc[+g]aatg[+g][+c]tgagtt-3' ([+N] – LNA-модификация), ttv-обратный-5'-gccccttgactbcggt-3', ttv-зонд-HEX-cggcacccgcct-MGB;

– праймеры и зонды для выявления ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО): ВКО-прямой-5'-gtcgcggttaattggcgc-3', ВКО-обратный-5'-ggccacgtgtttgatcga-3', ВКО-зонд-5'-FAM-atcttcgttagggcaagatcggcacaggcca-BHQ1-3', ВКО-стандарт5'-ggccacgtgtttgatcgaactttcgatcttcgttagggcaagatcggcacaggccagcccggccggaccggcgccaattaccgcgac-3';

– комплект средств индивидуальной защиты (одноразовые стерильные халаты, латексные перчатки, маски, бахилы, шапочки).

4. Технология осуществления метода

Метод, изложенный в данной инструкции, основан на мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров и молекулярного зонда к консервативному региону генома TTV, а также молекулярных зондов к участку ДНК β-глобинового гена человека и ВКО. Метод реализуется в несколько этапов.

Этапы

4.1 Получение и транспортировка биологического материала

В качестве биологического материала используют плазму (сыворотку), лейкоциты крови, слюну, назофарингеальные мазки.

Получение биологического материала осуществляют в соответствии с инструкцией о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований (приложение к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 № 1123).

Транспортировку образцов биоматериала в лабораторию осуществляют в течение 1-2 часов после их получения в термоконтейнере с температурным режимом +2...+8 °С. Подготовку исследуемого материала к экстракции ДНК осуществляют согласно инструкции производителя к наборам для экстракции.

4.2 Экстракция ДНК

Проводят с использованием коммерческих наборов, адаптированных для экстракции нуклеиновых кислот из определенного вида биологического материала человека. Экстракцию ДНК из плазмы (сыворотки) крови, слюны проводят в присутствии внутреннего контрольного образца.

4.3 Проведение ПЦР

4.3.1 Выявление TTV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках

Состав смеси для проведения ПЦР при выявлении TTV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках: деионизированная вода, ПЦР-смесь, праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК TTV и β -глобинового гена человека, раствор ДНК анализируемого образца. В каждую постановку необходимо включить анализируемые образцы, калибраторы и отрицательный контрольный образец. В качестве отрицательного контрольного образца используют буферный раствор, используемый для элюирования на стадии экстракции (включенный в состав набора для экстракции), не содержащий искомые ДНК, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве положительного контроля и для проведения

количественной оценки используют стандарты (калибраторы) с известным числом копий молекул ДНК.

4.3.2 Выявление TTV в плазме (сыворотке) крови, слюне

Состав смеси для проведения ПЦР при выявлении TTV в плазме (сыворотке) крови, слюне: деионизированная вода, ПЦР-смесь, праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК TTV и ВКО, раствор ДНК анализируемого образца.

В каждую постановку необходимо включить анализируемые образцы, калибраторы и отрицательный контрольный образец. В качестве отрицательного контрольного образца используют буферный раствор, используемый для элюирования на стадии экстракции (включенный в состав набора для экстракции), не содержащий искомые ДНК, прошедший все этапы пробоподготовки.

4.3.3 Программа для проведения ПЦР с целью выявления TTV в биологическом материале

Программа для проведения ПЦР: денатурация 1 цикл – 95°C 15 минут* (*температура и продолжительность этапа зависит от используемой ДНК-полимеразы и приведена в инструкции производителя); 45 циклов (95°C – 5 с, 63°C – 10с, 67°C – 10с), каналы детекции HEX/Yellow (TTV) и FAM/Green (β -глобин, ВКО).

4.4 Оценка результатов ПЦР

4.4.1 Анализ полученных данных

Полученные данные (кривые амплификации, кривые накопления флуоресцентного сигнала) анализируют с помощью программного обеспечения используемого амплификатора, установку настроек проводят в соответствии с инструкцией к нему. Интерпретацию выполняют на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (значение Ct – cycle threshold, «пороговый цикл»). Для

установления значения параметра пороговой линии (threshold/порог) выбирают логарифмическую шкалу для отражения результатов, визуально контролируют пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации, при необходимости порог изменяют в допустимом диапазоне. Для стандартов (калибраторов) должны детектироваться характерные кинетические кривые по каждому из каналов (FAM/Green и HEX/Yellow).

Данные считают валидными, если получены правильные результаты для стандартов (калибраторов), внутреннего контрольного образца, отрицательного контрольного образца (представлены в таблице). Для количественного теста результаты стандартов (калибраторов), полученные при проведении ПЦР, должны соответствовать указанным концентрациям (коэффициент вариации не более 25%).

Таблица – Результаты для стандартов (калибраторов), внутреннего контрольного образца, отрицательного контрольного образца

Контроль	Контроль этапа анализа	Значение порогового цикла (Ct) по каналу FAM/Green (канал ВКО)	Значение порогового цикла (Ct) по каналу HEX/Yellow (канал ТТВ)
стандарты (калибраторы)	ПЦР	определено	определено
внутренний контрольный образец	ПЦР, экстракция	определено	отсутствует
отрицательный контрольный образец	ПЦР, экстракция	отсутствует	отсутствует

Отсутствие характерной кинетической кривой по каналу FAM/Green (канал ВКО) является свидетельством ингибирования ПЦР или недостаточного количества биоматериала (ложноотрицательный

результат). Наличие характерных кинетических кривых хотя бы по одному из детектируемых каналов в отрицательном контрольном образце свидетельствует о загрязнении реакционной смеси или расходных материалов и некорректности постановки (ложноположительный результат). При несоответствии результатов для контролей проводят повторное исследование для всех образцов, начиная со стадии экстракции.

4.4.2 Построение калибровочной прямой

Для построения калибровочной прямой вносят концентрации стандартов (калибраторов), проводят оценку наклона и эффективности реакции, оптимальные значения составляют -3,322 и 1 (100%), соответственно, (коэффициент корреляции R^2 должен быть больше 0,99) . При значениях указанных параметров близких к оптимальным используют полученные количественные значения (копии ДНК TTV, копии ДНК ВКО) для расчета вирусной нагрузки ДНК TTV в биологических образцах.

4.5 Проведение расчета вирусной нагрузки TTV

4.5.1 Аналитическая чувствительность метода

Аналитическая чувствительность метода составляет 500 копий/мл. Если результат меньше, чем 500 копий/мл, то он интерпретируется следующим образом: ДНК TTV не выявлена или присутствует в концентрации ниже 500 копий/мл. Диапазон количественной оценки набора составляет 1500 копий/мл – 10^8 копий/мл. Если результат меньше, чем 1500 копий/мл, то он интерпретируется как результат менее 1500 копий ДНК TTV/мл. Если результат больше, чем 10^8 копий/мл, то он интерпретируется как результат более 10^8 ДНК TTV/мл.

4.5.2 Расчет вирусной нагрузки TTV в плазме (сыворотке) крови, слюне

При выявлении TTV в плазме (сыворотке) крови, слюне для количественной оценки вирусной нагрузки используют значения (копии ДНК TTV в мл), полученные с помощью программного обеспечения используемого амплификатора.

4.5.3 Расчет вирусной нагрузки TTV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках

При выявлении TTV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках для количественной оценки вирусной нагрузки проводят расчет по формуле. Расчет концентрации выражают в формате – логарифм копий ДНК искомого вируса на стандартное количество клеток человека (10^5) – который широко используется при количественной оценке ДНК вирусов в пробах ДНК при экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов. Коэффициент пересчета: 10^5 клеток = 2×10^5 геномов человека.

Формула для расчета вирусной нагрузки TTV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках:

$$\lg \text{копий ДНК TTV} / 10^5 \text{клеток} = \lg \frac{\text{число копий ДНК TTV в ПЦР пробе}}{\text{число копий ДНК } \beta\text{-глобина в ПЦР пробе}} \times 2 \times 10^5$$

4.6 Принятие управленческого решения

При выявлении TTV и определении вирусной нагрузки TTV устанавливают диагноз «B33.8 Другие уточненные вирусные болезни», медицинское наблюдение за пациентами осуществляется согласно п. 4 и 5 Клинического протокола «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с инфекционными и паразитарными заболеваниями» (утверждён постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.12.2018 № 94).

5. Перечень возможных осложнений или ошибок.

При точном соблюдении инструкции ошибки маловероятны.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ «МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ TTV В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ»

Семейство вирусов *Anelloviridae* (Анелловирусы) инфицирует широкий спектр видов млекопитающих. Из 34 родов семейства *Anelloviridae*, определенных Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV), восемь были описаны у людей, а именно роды *Alphatorquevirus* (обычно называемый вирусом Torque teno (TTV)), *Betatorquevirus* (обычно называемый вирусом Torque teno mini (TTMV)), *Gammatorquevirus* (обычно называемый вирусом Torque teno midi (TTMDV)), *Hetorquevirus*, *Yodtorquevirus*, *Lamedtorquevirus*, *Memtorquevirus* и *Samektorquevirus*, каждый из которых обладает генетическим разнообразием [1, 2]. Таксономия *Anelloviridae* регулярно обновляется, согласно Международному комитету по таксономии вирусов (ICTV) все названия видов приводят в биномиальном формате, таким образом, *Alphatorquevirus homin 1* – новое название вида *Torque teno virus 1*.

Анелловирусы являются одними из самых распространенных человеческих вирусов, считаются частью человеческого вирома. Частота выявления варьирует в разных регионах и группах населения, тем не менее, в некоторых исследованиях обнаружение TTV достигает 80% и выше [3]. Показано содержание *Anelloviridae* в различных биологических тканях и жидкостях, таких как кровь, слюна, моча, желчь, соскобы слизистой носоглотки, биоптаты печени, лимфоузлы, костный мозг и т.д., что обуславливает разные пути передачи вирусов, включая парентеральный, половой, вертикальный и, возможно, фекально-оральный.

Роль TTV в развитии тех или иных заболеваний до сих пор является предметом дискуссий. Ввиду широкой его распространенности, в том числе и среди здоровых людей, существует вероятность коинфекции с другими вирусами, ряд исследований посвящены изучению этого вопроса [4]. В последние годы растет число работ, в которых TTV изучается как маркер иммунного статуса человека среди различных групп пациентов с ослабленным иммунитетом, например, при трансплантации почек и печени, поскольку количество копий вируса TTV в периферической крови может отражать интенсивность иммуносупрессии [5, 6].

При проведении такого рода исследований большое значение имеет не только выявление вируса, но и количественная оценка вирусной нагрузки. TTV выявляют с помощью разных форматов полимеразной цепной реакции (ПЦР): стандартная, гнездовая ПЦР (nested-PCR), ПЦР в реальном времени (реал-тайм ПЦР, real-time PCR), однако, методы выявления не стандартизированы. Вследствие высокой генетической гетерогенности генома TTV выявление зависит от использованных праймеров, биологического материала. Измерение вирусной нагрузки TTV должно быть стандартизировано для получения точных и повторяемых данных в разных лабораториях и центрах. Поскольку TTV приобретает все большую привлекательность в качестве биомаркера в трансплантологии и других областях, таких как ревматология, онкология и инфекционные заболевания, необходим международный стандарт такой же, как те, которые установлены Всемирной организацией здравоохранения для других вирусов, передающихся через кровь [7]. Тем не менее, как правило, при изучении TTV исследователи вынуждены разрабатывать и использовать собственные тест-системы («in-house» тест-системы) для выявления данного вируса и его количественной оценки, работы в этом направлении ведутся и в Республике Беларусь [8].

При разработке таких тест-систем нужно учитывать ряд требований, таких как: выбор биологического материала, его отбор и хранение; экстракция нуклеиновых кислот; подбор праймеров, зондов, контролей и калибраторов; условия проведения ПЦР; определение эффективности анализа (эффективность амплификации, коэффициент корреляции, предел обнаружения и т.д.). Так, при подборе праймеров для выявления TTV необходимо учесть, что геном TTV состоит из кодирующего и не кодирующего регионов (UTR). Кодирующий регион включает несколько открытых рамок считывания и является переменным, поэтому его использование для проведения ПЦР приводит к снижению частоты выявления, в отличие от более стабильного не кодирующего. Для увеличения аффинности к мишени и биостабильности в праймерах и зондах для ПЦР применяют LNA-модификации (Locked Nucleic Acid), которые, увеличивая температуру плавления олигонуклеотида на 2–4°C, улучшают эффективность гибридизации с мишенью за счет формирования фиксированной конформации углеводного фрагмента, образованного метиленовым мостиком между атомом кислорода в 2'-положении и углеродом в 4'-положении [9]. Другой вариант модификации праймеров, расширяющий возможности ПЦР, достигается за счет включения в состав олигонуклеотида трипептида 1,2-дигидро(3H)-пиролло[3,2-е]индол-7-карбоксилата (CDPI3), интеркалирующего в малую бороздку ДНК и получившего соответствующее название MGB – Minor Groove Binder, что приводит к заметному повышению прочности связывания дуплексов ДНК [9].

Опубликованы исследования [10-14], в которых выявлена статистически значимая связь между величиной вирусной нагрузки TTV-ДНК в образцах слюны и тяжестью инфекции COVID-19 и исходом заболевания, показана роль уровня нагрузки TTV в мазках из носоглотки как предиктора поступления в отделение интенсивной терапии,

продемонстрирована предсказательная роль нагрузки TTV в отношении ответа на вакцину. Необходимы дальнейшие исследования для оценки клинической значимости количественного определения TTV как в крови, так и в дыхательных путях.

Список использованных источников

1. Virus Taxonomy: 2024 Release International Committee on Taxonomy of Viruses. – [сайт]. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения: 02.05.2025).
2. Laubscher, F. SCANellome V2: Update of the Primate Anellovirus Reference Sequences Database / F.Laubscher, L.Kaiser, S.Cordey/ Viruses. 2024 Aug 23;16(9):1349. doi: 10.3390/v16091349. PMID: 39339826; PMCID: PMC11435895.
3. Spezia, P.G. TTV and other anelloviruses: The astonishingly wide spread of a viral infection / P. G. Spezia, D. Focosi, A. Baj [et al.] // Asp. Mol. Med. – 2023. – Vol. 1: None. DOI: 10.1016/j.amolm.2023.100006.
4. Sabbaghian, M. The mysterious anelloviruses: investigating its role in human diseases / M.Sabbaghian, H.Gheitasi, A.A.Shekarchi [et al.] // BMC Microbiol. – 2024. – Vol. 24. – Art. 40 DOI: 10.1186/s12866-024-03187-7.
5. Gupta, G. Biomarkers in Kidney Transplantation: A Rapidly Evolving Landscape / G. Gupta, A. Athreya, A. Kataria // Transplantation. – 2024. – Jul. 18. DOI: 10.1097/TP.0000000000005122.
6. Mrzljak, A. Torque teno virus in liver diseases and after liver transplantation / A. Mrzljak, T. Vilibic-Cavlek // World J. Transplant. – 2020. – Vol. 10, № 11. – P. 291–296. DOI: 10.5500/wjt.v10.i11.291.
7. Baylis, S.A. et al. Standardization of nucleic acid tests: the approach of the World Health Organization / S.A. Baylis [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2019. – T. 57. – №. 1. – С. 10.1128/jcm. 01056-18.
8. Тест-система для проведения ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ДНК TTV в биологическом материале / В.М.Семенов,

С.К.Егоров, И.А.Лятос [и др.] // Гепатология и гастроэнтерология. – 2024. – Т. 8, № 1. – С. 36–41.

9. Гарафутдинов, Р.Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р.Р.Гарафутдинов, Ан.Х Баймиев, Г.В.Малеев [и др.] // Биомика. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 23–70.

10. Mendes-Correa, M.C. Torquetenovirus in saliva: A potential biomarker for SARS-CoV-2 infection? / M.C.Mendes-Correa, T.R. Tozetto-Mendoza, W.S. Freire [et al.] // PLoS One. 2021 Aug 24;16(8):e0256357. doi: 10.1371/journal.pone.0256357. PMID: 34428230; PMCID: PMC8384193.

11. Caixeta, R.A.V. Investigation of Oral Shedding of Torquetenovirus (TTV) in Moderate-to-Severe COVID-19 Hospitalised Patients / R.A.V. Caixeta, A.M. Batista, M.W. Caetano [et al.] // Viruses. 2024 May 24;16(6):831. doi: 10.3390/v16060831. PMID: 38932124; PMCID: PMC11209259.

12. Feghoul, L. Respiratory torque teno virus load at emergency department visit predicts intensive care unit admission of SARS-CoV-2 infected patients / L.Feghoul, A. Caillault, O. Peyrony [et al.] // J Med Virol. 2023 Dec;95(12):e29319. doi: 10.1002/jmv.29319. PMID: 38102899.

13. Imhof, C. The Time-Dependent Association of Torque Teno Virus Load with the Level of SARS-CoV-2 S1 IgG Antibodies Following COVID-19 Vaccination in Kidney Transplant Recipients. / C.Imhof, L. Messchendorp, D. van Baarle // Viruses. 2023 Oct 31;15(11):2189. doi: 10.3390/v15112189. PMID: 38005867; PMCID: PMC10674182.

14. Solis, M. Torque teno virus viral load predicts SARS-CoV-2 vaccine response in kidney transplant recipients / M.Solis, I.Benotmane, F.Gallais // J Med Virol. 2023 Jul;95(7):e28936. doi: 10.1002/jmv.28936. PMID: 37404001.