



<https://doi.org/10.34883/Pl.2025.14.4.003>
УДК 616-074-076.3:[578.52:578.233.42]



Осипкина О.В.¹, Воропаев Е.В.¹✉, Воропаева А.В.², Валентович Л.Н.³, Рымко А.Н.⁴,
Акалович С.Т.⁴, Ковалев А.А.¹

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, Гомель, Беларусь

³ Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «АртБиоТех», Минск, Беларусь

Разработка и апробация метода количественного определения ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста – Осипкина О.В.; концепция исследования, интерпретация данных, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования – Воропаев Е.В.; концепция исследования, сбор данных – Воропаева А.В.; сбор данных и их анализ, написание текста, редактирование – Валентович Л.Н.; дизайн исследования, анализ данных – Рымко А.Н.; дизайн исследования, анализ данных – Акалович С.Т.; анализ данных, редактирование – Ковалев А.А.

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения задания ГПНИ «Трансляционная медицина», под-программа 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки» 3.38 «Разработать алгоритм прогнозирования пост-COVID-19-ассоциированной патологии на основании изучения клинико-лабораторных и функциональных показателей» (реж. № 20220464, руководитель проекта к. м. н., доцент Е.В. Воропаев, сроки выполнения задания – 2022–2024 гг.).

Благодарности: авторы выражают благодарность Рубания Н.Н., Зяткову А.А., Шафоросту А.А. за участие в проведении лабораторных исследований.

Подана: 16.07.2025

Принята: 10.11.2025

Контакты: voropaev.evgenii@gmail.com

Резюме

Введение. Вирусы семейства *Anelloviridae* (анелловирусы), к которому относят род *Alphatorquevirus*, считают одним из основных компонентов человеческого вирома. Интерес к определению вирусной нагрузки обуславливает актуальность разработки и стандартизации качественных и количественных методов выявления.

Цель. Разработать и апробировать метод выявления и количественного определения ДНК представителей рода *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени.

Материалы и методы. Биологическим материалом для исследования стали плазма и лейкоциты крови 92 практически здоровых человек, плазма и лейкоциты крови, слюна и назофарингеальные мазки 28 пациентов с установленным диагнозом вторичного иммунодефицитного состояния. При разработке молекулярно-генетического метода выявления и количественного определения ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* человека использована TaqMan-ПЦР (полимеразная цепная реакция), проведена верификация методом секвенирования.

Результаты. Выполнен дизайн и подобрана нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* по высококонсервативной области генома; подобраны оптимальный состав реакционной смеси, программа амплификации. Разработан молекулярно-генетический метод выявления и количественного определения ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*

в биологическом материале человека. Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 500 копий/мл, диагностическая чувствительность – 95,7% (95% ДИ: 0,878; 0,991), диагностическая специфичность – 83,3% (95% ДИ: 0,626; 0,953), диагностическая эффективность – 92,5% (95% ДИ: 0,851; 0,969), предсказательная ценность положительного результата теста – 94,3% (95% ДИ: 0,86; 0,984), отрицательного – 87,0% (95% ДИ: 0,664; 0,972). Аналитическая специфичность метода определена *in silico* и секвенированием продуктов амплификации, расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами PV806635.1 – PV806639.1. Утверждена М3 Республики Беларусь инструкция по применению разработанного метода исследования «Метод количественного определения вирусов TTV в биологическом материале / О.В. Осипкина, Е.В. Воропаев, А.Н. Рымко, С.Т. Акалович, А.В. Воропаева, В.М. Мицуря, А.А. Ковалев. Инструкция по применению № 014-0525».

Заключение. В основе разработанного молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека, лежит принцип мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени, использованы оригинальные олигонуклеотидные праймеры и молекулярный зонд к консервативному региону генома вирусов рода *Alphatorquevirus*, подобраны оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации. Определены аналитические параметры метода и диагностические критерии выполняемых с его использованием тестов. Метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, полимеразная цепная реакция, количественная оценка, разработка метода, апробация



Osipkina O.¹, Voropaev E.¹✉, Voropaeva A.², Valentovich L.³, Rymko A.⁴, Akalovich S.⁴, Kovalev A.¹

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

³ Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

⁴ "ArtBioTech" LLC, Minsk, Belarus

Elaborating and Testing of a Quantification Method for Alphatorquevirus Genus Viruses DNA

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, data collection, results analysis and interpretation, text writing – Osipkina O.; study concept, data interpretation, final approval of the article version for publication – Voropaev E.; study concept, data collection – Voropaeva A.; data collection and analysis, text writing, editing – Valentovich L.; study design, data analysis – Rymko A.; study design, data analysis – Akalovich S.; data analysis, editing – Kovalev A.

Funding: the study was conducted as part of the State Program for Scientific Research "Translational Medicine" subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science" 3.38 "To create an algorithm for predicting post-COVID-19 associated pathology based on the study of clinical, laboratory, and functional indicators" (registration number 20220464, project manager PhD, Associate Professor E. Voropaev; assignment completion date: 2022–2024).

Acknowledgments: the authors express their gratitude to N. Rubanik, A. Zyatkov, and A. Shaforost for their participation in the laboratory research.

Submitted: 16.07.2025

Accepted: 10.11.2025

Contacts: voropaev.evgenii@gmail.com

Abstract

Introduction. Viruses of the Anelloviridae family (Anelloviruses), which includes the Alphatorquevirus genus, are considered one of the main components of the human virome. The interest in determining viral load stipulates the relevance of elaborating and standardizing both qualitative and quantitative detection methods.

Purpose. To elaborate and test a method for detecting and quantifying DNA of Alphatorquevirus species in human biological material based on real-time polymerase chain reaction.

Materials and methods. The biological material for testing was plasma and leukocytes from 92 apparently healthy individuals, and plasma and leukocytes from the blood, saliva and nasopharyngeal swabs from 28 patients with established diagnoses of secondary immunodeficiency. TaqMan PCR (polymerase chain reaction) was used to elaborate a molecular genetic method for detecting and quantifying human Alphatorquevirus DNA, and verification was performed by sequencing.

Results. The design and nucleotide sequence of primers and TaqMan probes for detecting Alphatorquevirus DNA in a highly conserved region of the genome were completed. The optimal reaction mixture composition and amplification program were selected. A molecular genetic method for detecting and quantifying DNA of Alphatorquevirus genus viruses in human biological material was elaborated. The analytical sensitivity of the method elaborated was 500 copies/ml, diagnostic sensitivity was 95.7% (95% CI: 0.878; 0.991), diagnostic specificity was 83.3% (95% CI: 0.626; 0.953), diagnostic efficiency was 92.5% (95% CI: 0.851; 0.969), the predictive value of a positive test result was 94.3% (95% CI: 0.86; 0.984), and of a negative result was 87.0% (95% CI: 0.664; 0.972). The analytical specificity of the method was determined in silico and by sequencing

the amplification products. The deciphered nucleotide sequences were deposited in the NCBI GenBank under accession numbers PV806635.1 – PV806639.1. The instructions for use of the elaborated research method "Method for TTV viruses quantification in biological material / Osipkina O., Voropaev E., Rymko A., Akalovich S., Voropaeva A., Mitsura V., Kovalev A. Instructions for use No. 014-0525" were approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus.

Conclusion. The elaborated molecular genetic method of laboratory diagnostics, enabling both qualitative detection and quantification of Alphatorquevirus DNA in human biological material, is based on the principle of multiplex real-time PCR. Original oligonucleotide primers and a molecular probe targeting a conserved region of the Alphatorquevirus genome were used. The optimal reaction mixture composition and amplification program were selected. The analytical parameters of the method and the diagnostic criteria for tests performed using the method were determined. The method demonstrated acceptable repeatability and reproducibility.

Keywords: laboratory diagnostics, polymerase chain reaction, quantification, method elaboration, testing

■ ВВЕДЕНИЕ

Вирусы рода Alphatorquevirus являются наиболее часто встречающимися среди анелловирусов, инфицирующих человека; род включает несколько десятков видов и характеризуется большим генетическим разнообразием [1]. Именно к роду Alphatorquevirus относится вирус Torque teno virus (TTV), впервые выделенный в 1997 г. Т. Нисидзawa с коллегами [2] у пациента после переливания крови. Таксономия семейства Anelloviridae регулярно обновляется. Согласно последним рекомендациям Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV, 2021), все названия видов вирусов оформляются в биномиальном формате. Так, сейчас вид Alphatorquevirus homin1 соответствует традиционному вирусу TTV1, который упоминается в большинстве публикаций и диагностических рекомендациях [3, 4].

Представители рода Alphatorquevirus повсеместно распространены, составляют 97% всех анелловирусов и формируют значительную долю (68%) вирома крови [1], могут быть обнаружены у 90% здоровых людей [5], а инфицированность среди дононров крови достигает 100% [6]. Считается, что вирусы рода Alphatorquevirus вызывают хроническую инфекцию без установленного заболевания или клинических проявлений, а концентрация этих вирусов в плазме крови рассматривается как потенциальный индикатор состояния иммунной системы и может использоваться, в частности, для прогнозирования риска инфицирования и отторжения трансплантата после пересадки солидных органов [1]. Поэтому в связи с широкой распространностью вирусов рода Alphatorquevirus диагностическое значение имеет прежде всего их количественная, а не качественная оценка.

Обнаружение вирусов рода Alphatorquevirus осуществляется с помощью молекулярно-генетических методов (из-за отсутствия клеточных культур): стандартная ПЦР, вложенная ПЦР (nested-PCR), ПЦР в реальном времени (real-time PCR), цифровая капельная ПЦР, секвенирование, в том числе высокопроизводительное.



Предпринимаются попытки разработать тесты на основе иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител, специфичных к белкам вириона *Alphatorquevirus*, но пока такие тесты не получили широкого распространения из-за слабой корреляции между серопозитивностью и вирусной нагрузкой [1].

В течение многих лет для выявления вирусов семейства *Anelloviridae* и оценки их количества исследователи использовали разработанные ими собственные (in-house) тест-системы [7], работы в этом направлении ведутся и в Республике Беларусь [8]. В последние годы был разработан и сертифицирован для клинического применения коммерческий набор TTV R-GENE (IVDR – for *in vitro* diagnostic use, для диагностики *in vitro*) (BioMerieux, Франция). Данный набор тестирували во многих исследованиях для сравнения с in-house тест-системами [9, 10]. Также проведено мультицентровое исследование с участием 13 лабораторий, показавшее высокую точность обнаружения и количественной оценки ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* [11]. Однако в Республике Беларусь в настоящее время отсутствуют зарегистрированные наборы реагентов для проведения данных анализов.

При разработке количественных методов определения нуклеиновых кислот нужно учитывать ряд требований, таких как выбор биологического материала, его отбор и хранение, выделение нуклеиновых кислот, подбор праймеров, зондов, контролей и калибраторов, условия проведения ПЦР, определение эффективности анализа (эффективность реакции амплификации, предел обнаружения и др.), определение диагностических показателей [12]. При подборе праймеров для выявления ДНК *Alphatorquevirus* необходимо учесть основные требования к их дизайну [13], а также структуру генома, включающего как вариабельные, так и консервативные участки, что существенно влияет на эффективность детекции [1]. Помимо выбора оптимальных праймеров, большое значение для характеристики метода детекции вирусов имеют его аналитические параметры, такие как предел обнаружения (LOD – Limit of Detection) и предел количественного определения (LOQ – Limit of Quantitation). Под пределом обнаружения понимают наименьшее количество аналита, которое можно выявить с уровнем достоверности 95% без точного количественного определения [12]. Аналитическую чувствительность метода оценивают с помощью серии разведений [14]. Пределом количественного определения является наименьшее количество измеряемой величины в образце, которое может быть количественно определено с указанной приемлемой точностью при указанных экспериментальных условиях [15]. LOQ определяют как минимальную концентрацию, при которой коэффициент вариации (CV) должен быть $\leq 35\%$ от рассчитанных ранее концентраций [15]. В таких случаях, если коэффициент вариации превышает установленный порог (35%) при определенном целевом количестве, затем снижается ниже порога при меньшем количестве, а затем снова увеличивается, за LOQ следует принимать наименьшее целевое значение, при котором CV не превышает установленный порог. Такие колебания обусловлены неточностью расчетных коэффициентов вариации, как правило, из-за слишком малого количества повторов при постановке тестов [15].

Под прецизионностью, согласно ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, понимают степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. Повторяемость (сходимость) – оценка результатов, полученных с помощью одного и того же метода одним и тем же оператором в одной и той же лаборатории с тем же оборудованием на одних и тех же образцах (условия

повторяемости) [16]. Воспроизводимость оценивают по результатам, полученным одним и тем же методом на идентичных объектах в разных лабораториях с использованием различного оборудования [16].

Следует отметить, что основными параметрами валидационной оценки при научных исследованиях, которые характеризуются низкой пропускной способностью и множеством различных типов образцов, являются аналитическая чувствительность и специфичность [12].

Несмотря на неослабевающий интерес исследователей к вирусам рода *Alphatorquevirus* и другим анелловирусам с момента их открытия, многие вопросы по-прежнему не решены, а роль данных вирусов в здоровье человека остается неясной. Есть мнение, что нельзя исключать патогенность отдельных представителей семейства *Anelloviridae*, которую сложно заметить из-за преобладания непатогенных форм [17]. Высокая представленность вирусов рода *Alphatorquevirus* в вироме человека, широкое распространение, вседеятельность и множество нерешенных вопросов обуславливают непрекращающиеся исследования, в том числе и в области лабораторной диагностики данного вируса. Возможно, будут разработаны диагностические системы, которые позволят не только обнаруживать и количественно оценивать весь спектр генетического разнообразия вирусов рода *Alphatorquevirus*, но и идентифицировать конкретные группы и генотипы.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать и апробировать метод выявления и количественного определения ДНК представителей рода *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет». Для разработки и апробации метода использовали биологический материал здоровых добровольцев (плазма и лейкоцитарная фракция крови) (N=92, 16 (17,4%) мужчин, 76 (82,6%) женщин, средний возраст – 39 лет (+/-12,44) [21,00; 64,00]), и пациентов с установленным диагнозом вторичного иммунодефицитного состояния на фоне основного заболевания (плазма и лейкоцитарная фракция крови, слюна, назофарингеальные мазки) (N=28, 12 (42,9%) мужчин, 16 (57,1%) женщин, средний возраст – 59,82 года (+/-18,50) [19,00; 87,00]). Участники исследования (жители г. Гомеля и Гомельской области) были проинформированы о целях и планируемых процедурах, от всех получено письменное информированное согласие.

При разработке метода выявления и количественного определения ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* человека использовали TaqMan-ПЦР, основанную на применении флуоресцентно-меченых гидролизуемых олигонуклеотидных зондов (проб) и 5'-экзонуклеазной активности полимеразы [18, с. 42]. Выявление и определение количества ДНК *Alphatorquevirus* включало два этапа: выделение ДНК из образцов биологического материала и мультиплексная ПЦР. Выделение нуклеиновых кислот из образцов биологического материала проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» («Амплисенс» ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) согласно инструкции производителя.



Дизайн праймеров и зондов проводили с использованием программ для подбора и анализа олигонуклеотидных праймеров Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). С целью обеспечения высокой чувствительности и специфичности теста при максимальном охвате вариантов вируса в качестве мишени выбран консервативный регион генома вирусов рода *Alphatorquevirus*. Для его идентификации были использованы нуклеотидные последовательности всех представителей рода, имеющихся в базе данных геномов Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=687331>), проведено объединение последовательностей в многомерный FASTA-файл и множественное выравнивание при помощи онлайн-ресурса с алгоритмом Muscle: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>.

Синтез праймеров, зондов, внутреннего контрольного образца (ВКО) и стандартов осуществлен в ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). Для проведения ПЦР использованы реагенты производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь).

Оптимизация ПЦР включала подбор компонентов реакционной смеси и параметров термоциклирования (температурный профиль и длительность каждого этапа цикла). При выявлении ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках в качестве эндогенного внутреннего контроля использована одновременная амплификация консервативного участка генома *Alphatorquevirus* и участка β-глобинового гена человека. В ПЦР-смесь включали праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* и β-глобинового гена человека (β-глобиновый ген должен присутствовать в образце в количестве, эквивалентном количеству клеток, – 10^3 – 10^5 геном-эквивалентов). При выявлении ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* в плазме крови и слюне выделение нуклеиновых кислот из каждого образца биоматериала проводили в присутствии экзогенного ВКО. В ПЦР-смесь включали праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* и для выявления ДНК ВКО. В каждую постановку ПЦР включали анализируемые образцы, калибраторы и отрицательный контрольный образец. В качестве отрицательного контрольного образца использовали буфер для элюции, не содержащий целевые ДНК и проходивший все стадии пробоподготовки.

Проведение реакции амплификации, анализ и учет результатов осуществляли при помощи амплификатора Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Подобрана программа амплификации: денатурация 1 цикл – 95 °C, 15 мин; 45 циклов (95 °C – 5 с, 63 °C – 10 с, 67 °C – 10 с), каналы детекции HEX/Yellow (ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*) и FAM/Green (ДНК β-глобина, ДНК ВКО). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения используемого амплификатора, настройки устанавливали в соответствии с инструкцией к нему. Для стандартов (калибраторов) детектировались характерные кинетические кривые по каждому из каналов (FAM/Green и HEX/Yellow). Данные считали валидными, если были получены правильные результаты для стандартов (калибраторов), ВКО и отрицательного образца. Для построения калибровочной прямой в реакцию добавляли стандартные растворы калибраторов с известными показателями концентрации. После достижения оптимальных параметров амплификации (наклон, эффективность, коэффициент корреляции R^2) полученные количественные показатели (копии ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*, β-глобина человека и ВКО) использовали для расчета вирусной нагрузки в биологических образцах.

Для количественной оценки вирусной нагрузки в плазме крови и слюне использовались значения количества копий ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* на миллилитр (копии/мл) и их логарифмическое преобразование (\log_{10} копий/мл), рассчитанные с помощью программного обеспечения амплификатора.

Для количественной оценки вирусной нагрузки в клетках крови, назофарингеальных мазках проводили расчет вирусной нагрузки по формуле, которая широко используется при количественной оценке ДНК вирусов в пробах ДНК при выделении тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов. Коэффициент пересчета: 10^5 клеток = 2×10^5 геномов человека.

Формула для расчета вирусной нагрузки *Alphatorquevirus* в клетках крови, назофарингеальных мазках:

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

Аналитическая специфичность разработанных олигонуклеотидов и зондов определена *in silico* с помощью программного приложения Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата секвенированием продуктов амплификации. Секвенирование проведено по методу Сэнгера (метод обрыва цепи) с использованием прибора «Нанофор-05» (РФ).

Аналитическую чувствительность метода оценивали с использованием серии последовательных разведений положительного контрольного образца (К1, 10^3 копий/мл ДНК TTV). Были протестированы концентрации, содержащие 500, 250 и 125 копий/мл, каждая в шести повторах. Наименьшее разведение с показателем обнаружения 6/6 было определено как предел обнаружения [14]. Предел количественного определения рассчитан по рекомендациям для исследований с малым числом повторов [15].

Оценка повторяемости и воспроизводимости проведена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 [19]. Повторяемость оценена на базе НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» при проведении анализа стандартного образца в девяти повторностях. Значение стандартного отклонения повторяемости (S) составило 0,0406 (\log_{10} копий в мл), коэффициент вариации (CV) – 0,82%, предел повторяемости (r) – 0,1138 (\log_{10} копий в мл). Воспроизводимость оценена при проведении анализа 21 образца биологического материала на базе НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» и лаборатории вирусологических исследований, диагностики ВИЧ/СПИД и особо опасных инфекций ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Диагностическую надежность лабораторного теста оценивали по рекомендованным критериям: диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, диагностическая эффективность, предсказательная ценность положительного (ПЦ+) и отрицательного результатов теста (ПЦ-) [20, с. 124]. Оценка диагностической информативности лабораторного теста базируется на предварительном точном установлении диагноза заболевания с использованием рентгенологического, ультразвукового и других видов исследований [20, с. 124], однако в данном случае



такой подход невозможен, так как в настоящее время считается, что вирусы рода *Alphatorquevirus* являются пантропными и повсеместно распространены, а их патогенность в отношении человека не подтверждена [1]. Для расчета диагностических характеристик можно использовать сравнение результатов индексного теста с результатами наилучшего в настоящее время и вполне доступного теста, называемого эталонным стандартом. Этalonным стандартом может быть «золотой стандарт» с чувствительностью и специфичностью, равными 100% [21]. Поскольку в Республике Беларусь в настоящее время отсутствуют зарегистрированные наборы реагентов для выявления и количественной оценки представителей рода *Alphatorquevirus*, можно сделать вывод об отсутствии теста, который допустимо назвать «золотым стандартом». Существуют методы, разработанные и используемые для оценки диагностической точности тестов в случаях, когда «золотой стандарт» отсутствует или недоступен [21]. Например, применяют метод построения составного эталонного стандарта. Этот метод объединяет результаты нескольких несовершенных тестов (за исключением индексного теста) с заранее заданным правилом для построения эталонного стандарта, используемого для оценки индексного теста [21]. Обоснованием для такого вида сравнения в выполненном исследовании послужили также опубликованные работы, в которых ввиду высокого разнообразия генетической последовательности вируса для детекции всего спектра существующих генотипов в пределах рода *Alphatorquevirus* предлагается использовать несколько наборов праймеров [22]. Для построения составного эталонного стандарта были объединены результаты нескольких тестов выявления TTV (за исключением разработанного метода), полученных при проведенных ранее исследованиях [23]: с помощью наборов праймеров для выявления по кодирующему и консервативному регионам и коммерческого набора реагентов «ПОЛИГЕП-ТТВ» (ООО «Научно-производственная фирма ЛИТЕХ», РФ). С использованием указанных вариантов технологии исследования было оценено выявление ДНК TTV в одной из целевых групп пациентов (здоровые добровольцы). Для расчета критериев диагностической надежности использованы широко известные формулы [20, с. 125].

Выявление *Alphatorquevirus*-специфических иммуноглобулинов (TTV-IgG и TTV-IgM) в плазме крови здоровых добровольцев осуществляли методом ИФА с использованием наборов реагентов Qualitative Human Transfusion Transmitted Virus Antibody IgG (TTV-IgG) Elisa Kit MyBioSource.com и Qualitative Human Transfusion Transmitted Virus Antibody IgM (TTV-IgM) Elisa Kit MyBioSource.com, предназначенных для исследований, не для диагностики, интерпретация результатов согласно инструкции производителя.

Статистический анализ данных выполнялся с помощью языка программирования R (версия 4.5.0), с применением библиотеки tidyverse (версия 2.0.0), ggstatsplot (версия 0.12.1), rstatix (0.7.2), cutpointintr (1.1.2), caret (6.0.94), pROC (1.18.4). Описание количественных признаков представлено в виде среднего значения и стандартного отклонения (Mean (SD)), минимума и максимума – для оценки диапазона разброса значений показателя (Min; Max). Для проверки соответствия распределения количественных данных нормальному распределению применялся критерий Шапиро – Уилка (W). Для оценки повторяемости использованы значения стандартного отклонения повторяемости (S_r), коэффициента вариации (CV), предела повторяемости (r). Для оценки воспроизводимости использованы значения стандартного отклонения

воспроизводимости (S_R), относительного стандартного отклонения воспроизводимости (RSD_R), предела воспроизводимости (R). Категориальные признаки представлены в виде значений абсолютных и относительных частот (долей) встречаемости значений признака. Анализ согласованности диагностических тестов выполнен с помощью теста МакНемара – Букера и каппы Коэна (к Коэна). Для оценки диагностической эффективности рассчитаны операционные характеристики: диагностическая чувствительность (Se), диагностическая специфичность (Sp), точность (Acc), положительная (PPV) и отрицательная (NPV) прогностическая ценность.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выполнен дизайн и подобрана нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus: TTV-Art-прямой-5'-cc[+g]aatg[+g][+c]tgagtt-3' ([+N] – LNA-модификация), TTV-Art-обратный-5'-gcccccttgactbcgg-3', TTV-Art-зонд-5'-HEX-cggcaccsccct-MGB-BHQ1-3'. С помощью множественного выравнивания найдена высококонсервативная область генома вирусов рода Alphatorquevirus для отжига праймеров (в качестве примера на рисунке приведена зона отжига обратного праймера), тем не менее один из праймеров имеет вырожденную позицию. Для увеличения аффинности к мишени использованы LNA- (Locked Nucleic Acid) и MGB-модификации (Minor Groove Binder) праймеров.

Для амплификации участка β -глобинового гена человека выбраны праймеры [24] и выполнен дизайн TaqMan-зонда: β -глобин-прямой-5'-tgcacgtggatcctgagaact-3' β -глобин-обратный-5'-aattttgccaagtgtatggg-3', β -глобин-зонд-5'-FAM-caggctctgggcaacgtgctg-BHQ1-3'.

В качестве положительного контроля и для проведения количественной оценки использованы синтетические стандарты (калибраторы) с известным числом копий (K1 – 10³ копий/мл, K2 – 10⁴ копий/мл, K3 – 10⁵ копий/мл, K4 – 10⁶ копий/мл, K5 – 10⁷ копий/мл, K6 – 10⁸ копий/мл).

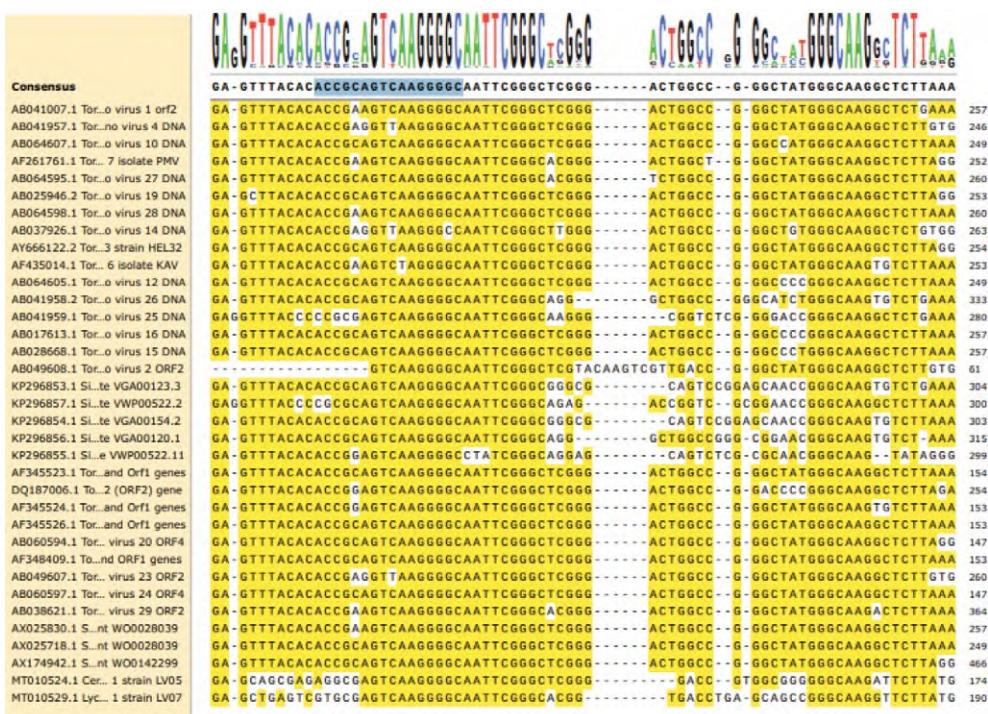
Стандарты (калибраторы) ДНК β -глобинового гена: tgcacgtggatcctgagaacttcaggctcctgggcaacgtgctggctgtgtctggccatcaacttggcaagaatt.

На рисунке представлены результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей представителей рода Alphatorquevirus, вошедших в базу данных геномов NCBI.

Стандарты (калибраторы) для выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus: Ccgaatggctgagtttccacgcccgtcccgacgggtgaagccacggagggatcagcgcgtcccgagggcggtgc cggaggtgagttacacaccgcagtcaggccc.

Структура экзогенного ВКО, а также структура праймеров [25] и оригинального зонда для его выявления: ВКО-прямой-5'-gtcgccgttaattggcgc-3', ВКО-обратный-5'-ggccacgtttgatcga-3', ВКО-зонд-5'-FAM-atttcggttagggcaagatcggcacaggcca-BHQ1-3', ВКО-стандарт5'ggccacgtttgatcgaactttcgatctcggttagggcaagatcggcacaggccaagcccgccggc cggaccggcgccaaattaccgcgcac-3'.

Аналитическая специфичность разработанных олигонуклеотидов и зондов определена *in silico*, а также при исследовании нескольких клинических образцов. Полученные ампликоны секвенировали, расшифрованные нуклеотидные последовательности сопоставляли с референсными геномами вирусов рода Alphatorquevirus, после чего те были депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами: PV806635.1, PV806636.1, PV806637.1, PV806638.1, PV806639.1.



Результат множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей всех представителей рода Alphatorquevirus, которые занесены в базу данных геномов NCBI
Result of multiple alignment of nucleotide sequences of all representatives of the genus Alphatorquevirus, which are presented in the NCBI genome database

Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 500 копий/мл (5 копий в реакцию). Такое значение аналитической чувствительности метода согласуется с данными литературы о возможностях количественного ПЦР-анализа [15]. Так, исследователями биоаналитической лаборатории TATAA Biocenter показано, что в условиях отсутствия ошибок LOD при 95%-й достоверности составляет 3 молекулы ДНК-матрицы [15], а для большинства реальных образцов LOD зависит от шума, вносимого выборкой, методов выделения и других факторов и может быть существенно выше. Предел количественного определения разработанного метода составил 1500 копий/мл. Диапазон количественной оценки метода составил 1500 копий/мл – 10⁸ копий/мл. Полученные характеристики сопоставимы с характеристиками тест-системы TTV R-GENE (BioMerieux, Франция), представленными в открытом доступе на интернет-ресурсах: данная система основана на ПЦР в реальном времени, технология TaqMan (целевой регион TTV 5'-UTR область, 128 пар нуклеотидов) включает набор для выделения, премикс для амплификации, внутренний контроль, отрицательный контроль, четыре стандарта количественного определения; заявленный динамический диапазон количественной оценки составляет 250 копий/мл – 10⁹ копий/мл, позволяет обнаружить и измерить ДНК TTV в образцах плазмы и цельной крови [26].

Значение стандартного отклонения воспроизводимости (S_R) составило 0,5804 (\log_{10} копий ДНК TTV / 10^5 клеток), относительное стандартное отклонение воспроизводимости (RSD_R) – 19,05%, доля общей вариации, обусловленная системой измерений (GRR), – 6,5%, предел воспроизводимости (R) – 1,6251 (\log_{10} копий ДНК *Alphatorquevirus* / 10^5 клеток). Полученный результат сопоставим с внутри- и межлабораторными показателями, продемонстрированными в мультицентровом исследовании коммерческого набора TTV R-GENE (BioMerieux): межлабораторное стандартное отклонение составляет 0,17 \log_{10} копий/мл и внутрилабораторное – от 0,03 до 0,20 \log_{10} копий/мл (в ходе внедрения), а также межлабораторное SD – 0,19 \log_{10} копий/мл и внутрилабораторное SD – от 0,07 до 0,18 \log_{10} копий/мл (в ходе испытаний) [11]. Таким образом, разработанный метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости.

Антитела класса M к вирусам рода *Alphatorquevirus* выявлены у 14 (15,2%) здоровых добровольцев, антитела класса G к вирусам рода *Alphatorquevirus* – у 37 (40,2%).

Сравнение ряда методов выявления вирусов рода *Alphatorquevirus* в плазме крови здоровых добровольцев, включая ИФА на TTV-IgG и TTV-IgM, ПЦР с использованием наборов праймеров для кодирующего и консервативного регионов, применение коммерческого набора «ПОЛИГЕП-ТТВ» и предложенного нами молекулярно-генетического метода позволили получить результаты, сводящиеся к выявлению существенной степени согласия между разработанным методом и составным эталонным стандартом (коэффициент «к Коэна» составил 0,801); установлению умеренной степени согласия между разработанным методом, определением по консервативному региону (вложенная ПЦР), выявлением по кодирующему региону и с помощью коммерческого набора «ПОЛИГЕП-ТТВ» (коэффициент «к Коэна» 0,6 и 0,4 соответственно). Степень согласия между всеми вариантами выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*, использованными в данном исследовании, и выявлением *Alphatorquevirus*-специфических иммуноглобулинов была слабой, что согласуется с данными литературы [1].

С использованием метода построения составного эталонного стандарта определены диагностические критерии: диагностическая чувствительность реализуемого с использованием разработанного метода теста составила 95,7% (95% ДИ: 0,878; 0,991), диагностическая специфичность – 83,3% (95% ДИ: 0,626; 0,953), диагностическая эффективность – 92,5% (95% ДИ: 0,851; 0,969), предсказательная ценность положительного результата теста – 94,3% (95% ДИ: 0,86; 0,984), отрицательного – 87,0% (95% ДИ: 0,664; 0,972). Коэффициент «к Коэна» составил 0,801, что указывает на существенную степень согласия анализируемых тестов (р теста МакНемара = 1). Согласно данным литературы, диагностическая специфичность теста должна быть не менее 80% [20], следовательно, разработанный метод продемонстрировал достаточно высокую диагностическую надежность.

Таким образом, разработан молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики, позволяющий проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека. Метод основан на полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени в мультиплексном формате с использованием праймеров к участку β -глобинового гена человека и оригинальных олигонуклеотидных праймеров к консервативному региону генома вирусов рода *Alphatorquevirus*, а также молекулярных зондов; подобраны оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации.



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В основе разработанного молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека, лежит принцип мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени, использованы оригинальные олигонуклеотидные праймеры и молекулярный зонд к консервативному региону генома вирусов рода *Alphatorquevirus*, подобран оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации.

Определены аналитические характеристики разработанного метода лабораторной диагностики инфекции, вызванной вирусами рода *Alphatorquevirus* (аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, повторяемость и воспроизводимость). Аналитическая чувствительность составила 500 копий/мл, диапазон измерений 1500 – 10⁸ копий/мл. Метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости. Аналитическая специфичность метода определена *in silico* и секвенированием продуктов амплификации, расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами PV806635.1 – PV806639.1.

Расчет диагностических критериев, выполненный по методу построения составленного эталонного стандарта, показал высокую надежность разработанного молекулярно-генетического метода, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов *Alphatorquevirus* в биологическом материале человека: диагностическая чувствительность составила 96%, диагностическая специфичность – 83%, диагностическая эффективность – 92%, предсказательная ценность положительного результата – 94% и отрицательного результата – 87%.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Brani P, Manzoor H.Z., Spezia P.G., et al. Torque Teno Virus: Lights and Shades. *Viruses*. 2025 Feb;27(3):334. doi: 10.3390/v17030334
2. Nishizawa T, Okamoto H, Konishib K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec;241(1):92–97. doi: 10.1006/bbrc.1997.7765
3. Virus Taxonomy: 2024 Release International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <https://ictv.global/taxonomy> (accessed 22.09.2025).
4. Varsani A., Kraberger S., Opriessnig T., et al. *Anelloviridae* taxonomy update 2023. *Arch Virol*. 2023;168:277. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05903-6>
5. Jaksch P, Görzer I, Puchhammer-Stöck E, et al. Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: The Road Toward Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. *Transplantation*. 2022 Oct;106(10):1940–1951. doi: 10.1097/TP.0000000000004153
6. Kuczaj A, Przybylowski P, Hrapkowicz T. Torque Teno Virus (TTV)-A Potential Marker of Immunocompetence in Solid Organ Recipients. *Viruses*. 2023 Dec 21;16(1):17. doi: 10.3390/v16010017
7. Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2001 Dec;75(24):11999–12004. doi: 10.1128/JVI.75.24.11999-12004.2001
8. Semenov V.M., Yahorau S.K., Lyatos I.A., et al. Real-time PCR test system for TTV DNA detection in biological material. *Hepatology and Gastroenterology*. 2024;1:36–41. doi: 10.25298/2616-5546-2024-8-1-36-41 (in Russian)
9. Reyes N.S., Laham G., Boccia N., et al. Prospective cohort study of Torque Teno Virus (TTV) viral load kinetics and the association with graft rejection in renal transplant patients. *J Clin Virol*. 2023 Aug;165:105501. doi: 10.1016/j.jcv.2023.105501
10. Reyes N.S., Spezia P.G., Jara R., et al. Torque Teno Virus (TTV) in Renal Transplant Recipients: Species Diversity and Variability. *Viruses*. 2024 Mar 11;16(3):432. doi: 10.3390/v16030432
11. Gore E.J., Gard L., Bourgeois P., et al. TTVguideTX consortium partners. Validation, implementation and quality control of a Torque Teno Virus qPCR in a multinational clinical trial. *J Clin Virol*. 2024 Dec;175:105738. doi: 10.1016/j.jcv.2024.105738
12. Doronin M.I., Mikhaliushin D.V., Sprygin A.V., et al. Current approaches to development of real-time qPCR test-kits. *Veterinary Science Today*. 2023;12(3):197–207. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207> (in Russian)
13. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., et al. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biometrics*. 2019;11(1):23–70. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmc.2019-04> (in Russian)
14. Manalo D.L., Bolívar J.K.G., Ermino K.I.T., et al. Development of a SYBR Green-Based Real-Time PCR Assay to Detect *Oncomelania hupensis* quadrads DNA in Environmental Water Samples. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2025;10(5):140. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10050140>
15. Forootan A., Sjöback R., Björkman J., et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 2017 Apr 29;12:1–6. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001

16. GOST R ISO 5725-1-2002 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions*. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/2995/> (accessed 25.09.2025) (in Russian)
17. Spezia P.G., Focosi D., Baj A., et al. TTV and other anelloviruses: The astonishingly wide spread of a viral infection. *Asp Mol Med.* 2023;1: None. doi: 10.1016/j.amolm.2023.100006
18. Podutov V., Baranov O., Voropaev E. (2007) *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk: Unipol. (in Russian)
19. GOST R ISO 5725-6-2002 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 6. Use in practice of accuracy values*. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/2800/> (accessed 25.09.2025) (in Russian)
20. Kamyshevnikov V.S. (2009) *Handbook of Clinical and Biochemical Research and Laboratory Diagnostics*. Moscow: MEDpress-inform. (in Russian)
21. Umemneku Chikere C.M., Wilson K., Graziadio S., et al. Diagnostic test evaluation methodology: A systematic review of methods employed to evaluate diagnostic tests in the absence of gold standard – an update. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223832>
22. Hu Y.W., Al-Moslih M.I., Al Ali M.T., et al. Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3747–54. doi: 10.1128/JCM.43.8.3747-3754.2005
23. Osipkina O.V., Voropaev E.V., Mitsura V.M., et al. Comparison of different DNA detection options for TTV, TTMDV, and TTMV viruses. *Health and Ecology Issues.* 2022;19(1):102–108. (In Russ.) <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2022-19-1-13>
24. Irenege L.M., Robert A., Gala J.L. Quantitative assessment of human beta-globin gene expression in vitro by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2395–6. doi: 10.1373/clinchem.2005.056630
25. Jacquet N., Wurtzer S., Darracq G., et al. Effect of concentration on virus removal for ultrafiltration membrane in drinking water production. *Journal of Membrane Science.* 2021;634:119417. ISSN 0376-7388. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2021.119417>
26. Spezia P.G., Carletti F., Novazzi F., et al. Torquatenovirus Viremia Quantification Using Real-Time PCR Developed on a Fully Automated, Random-Access Platform. *Viruses.* 2024 Jun 15;16(6):963. doi: 10.3390/v16060963