

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**Метод молекулярно-генетической диагностики  
ТТ-вирусной инфекции**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

**АВТОРЫ:**

О.В. Осипкина, Е.В. Воропаев, В.М. Мицура, Д.В. Терешков,  
А.А. Зяцьков, О.Ю. Баранов

Гомель, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложен молекулярно-генетический метод диагностики ТТ-вирусной инфекции, включающий выявление ДНК вирусов ТТV (Transfusion-transmitted virus, Torque teno virus), ТТМV (Torque Teno mini virus), ТТМДV (Torque teno midi virus). В основе метода – полимеразная цепная реакция (ПЦР) в формате nested (гнездовой) с электрофоретической детекцией.

## **1. Область применения**

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение наличия вирусов видов ТТV, ТТМV, ТТМДV при острых и хронических заболеваниях печени, при трансплантации органов (дополнительный маркер иммуносупрессии).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-трансплантологов и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь пациентам с острыми и хроническими заболеваниями печени.

**2. Показания к применению:** острые и хронические заболевания печени вирусной этиологии (МКБ10 коды В15–В19), включая хронический вирусный гепатит неуточненный (МКБ10 код В18.9), болезни печени другой этиологии (МКБ10 коды К70–К77), наличие трансплантированных органов и тканей (МКБ10 код Z94).

**3. Противопоказания к применению:** отсутствуют.

**4. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения**

**4.1. Изделия медицинской техники для пробоподготовки и выделения ДНК:**

— ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;

- Высокоскоростная термостатированная центрифуга, 10000–15000×g, диапазон рабочих температур 0<sup>0</sup>C – +25<sup>0</sup>C;
- Твердотельный термостат, диапазон температур -10<sup>0</sup>C -+99<sup>0</sup>C;
- Микроцентрифуга-вортекс;
- Насос с колбой-ловушкой;
- Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл);
- Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки нуклеиновых кислот;
- Холодильник, диапазон рабочих температур +2<sup>0</sup>C - +4<sup>0</sup>C;
- Морозильная камера, диапазон рабочих температур -16<sup>0</sup>C - -18<sup>0</sup>C;
- УФ-стерилизатор, или его аналог.

#### **4.2. Изделия медицинской техники для проведения ПЦР**

- Амплификатор (термоциклер);
- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
- Микроцентрифуга-вортекс;
- Твердотельный термостат, диапазон температур -10<sup>0</sup>C -+ 99<sup>0</sup>C;
- Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл);
- Холодильник, диапазон рабочих температур +2<sup>0</sup>C - +4<sup>0</sup>C;
- Морозильная камера, диапазон рабочих температур -16<sup>0</sup>C - -18<sup>0</sup>C.

#### **4.3. Изделия медицинской техники для электрофоретической детекции**

- Дозатор пипеточный (0,5-10 мкл);
- Холодильник, диапазон рабочих температур +2<sup>0</sup>C - +4<sup>0</sup>C;
- Морозильная камера, диапазон рабочих температур -16<sup>0</sup>C - -18<sup>0</sup>C;
- Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров;

- УФ- трансиллюминатор;
- Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером.

**4.4. Изделия медицинского назначения:** ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок и др. Необходимы наборы реагентов для экстракции ДНК, для амплификации, для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле. Перечень набора основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использования коммерческих наборов.

## **5. Технология осуществления метода**

Метод молекулярно-генетической диагностики ТТ-вирусной инфекции включает выделение ДНК, ПЦР в формате nested и электрофоретическую детекцию.

Этапы:

1) Взятие и транспортировка биологического материала. Проводится в соответствии с правилами для проведения молекулярно-генетических исследований. В качестве биологического материала можно использовать плазму крови, биоптаты тканей и другие клинические образцы.

2) Экстракция ДНК. Выделение ДНК можно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

3) Проведение ПЦР. Выявление ДНК изучаемых вирусов проводят методом ПЦР в формате nested (гнездовой) с применением праймеров для консервативного региона. Структура праймеров и программа для проведения ПЦР приведены в таблицах 1 и 2,

соответственно. Для проведения ПЦР можно использовать готовые коммерческие смеси, температура и время денатурации зависят от используемой ПЦР-смеси.

Таблица 1 – Структура праймеров для первого раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTV, TTMV и TTMDV

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
NG779-прямой	ACWKMCGAATGGCTGAGTTT
NG780-прямой	RGTGRCGAATGGYWGAGTTT
NG781-обратный	CCCKWGCCCCGARTTGCCCCT
NG782-обратный	YCTWGCCCCGAATTGCCCCT

Таблица 2 – Программа для проведения первого раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTV, TTMV и TTMDV

№	Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	30 с	35
	Отжиг	55	30 с	
	Элонгация	72	30 с	
3	Элонгация	72	7 мин	1
4	Охлаждение	4	3 мин	1

Для второго раунда ПЦР использованы ампликоны, полученные в результате первого раунда. Структура праймеров для проведения второго раунда ПЦР для выявления ДНК TTV, TTMV и TTMDV приведена в таблицах 3,4,5.

Таблица 3 – Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTV

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'

NG779-прямой	ACWKMCGAATGGCTGAGTTT
NG780-прямой	RGTGRCGAATGGYWGAGTTT
NG785-обратный	CCCCTTGACTBCGGTGTGTAA

Таблица 4 – Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТТМV

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
NG792-прямой	TTTATGCGYGCYAGACGRAGA
NG793-прямой	TTTAYCMYGCCAGACGGAGA
NG794-прямой	TTTATGCCGCCAGACGRAGG
NG791-обратный	CTCACCTYSGGCWCCCGCCC

Таблица 5 – Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТТМDV

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
NG795-прямой	SGABCGAGCGCAGCGAGGAG
NG796-обратный	GCCCGARTTGCCCCTAGACC

Программа для проведения второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТTV, ТТМV и ТТМDV приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Программа для проведения второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК ТTV, ТТМV и ТТМDV

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	30 с	25
	Отжиг	55	30 с	
	Элонгация	72	30 с	

3	Элонгация	72	7 мин	1
4	Охлаждение	4	3 мин	1

4) Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР. Проводят горизонтальный гель-электрофорез с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия (концентрация 0,1-0,5 мкг/мл). Для визуализации полученных результатов и цифрового фотодокументирования изображения используют специализированную (для УФ-сканирования) видеосистему и соответствующее программное обеспечение.

5) Интерпретация результатов. Интерпретация результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-), не должно быть никаких полос. Если в отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы, значит, произошла контаминация реактивов или образцов. Результаты анализа считают недействительными, требуется повторить анализ образцов, а также выявить источник контаминации. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (ТТV+, ТТMV+ и ТТMDV+) должна быть полоса положительного контроля. В качестве положительных контрольных образцов использованы образцы, в которых методом секвенирования установлено наличие ДНК соответствующих вирусов. При проведении анализа в качестве отрицательного контроля (К-) можно использовать бидистиллированную воду, в качестве положительного контрольного образца можно использовать образцы, определенные как позитивы в предыдущих исследованиях (оптимально – подтверждение методом секвенирования). Кроме специфических полос в дорожках могут наблюдаться полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже

уровня 100 пар нуклеотидов (п.н.) и не учитываются при оценке результатов анализа. На рисунках 1-3 в качестве иллюстрации приведена электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов, соответствующих ДНК вирусов TTV, TTMV и TTMDV.

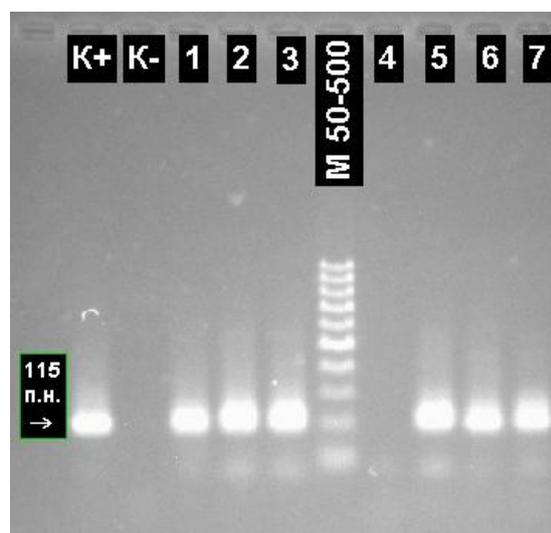


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов TTV

Как показано на рисунке 1, наличие зоны размером 115 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов TTV. Образцы № 1, 2, 3, 5, 6, 7 – являются «положительными», в данных образцах обнаружена ДНК вирусов TTV. Образец № 4 – является «негативным», ДНК вирусов TTV не обнаружена. Для интерпретации результатов используют таблицу 7.

Таблица 7 – Интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования клинического материала с целью выявления ДНК вирусов TTV

Электрофоретическая детекция	Результат
наличие специфических полос размером 115 п.н.	Обнаружена ДНК вирусов TTV

отсутствие специфических полос размером 115 п.н.	Не обнаружена ДНК вирусов ТТМV
в отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны

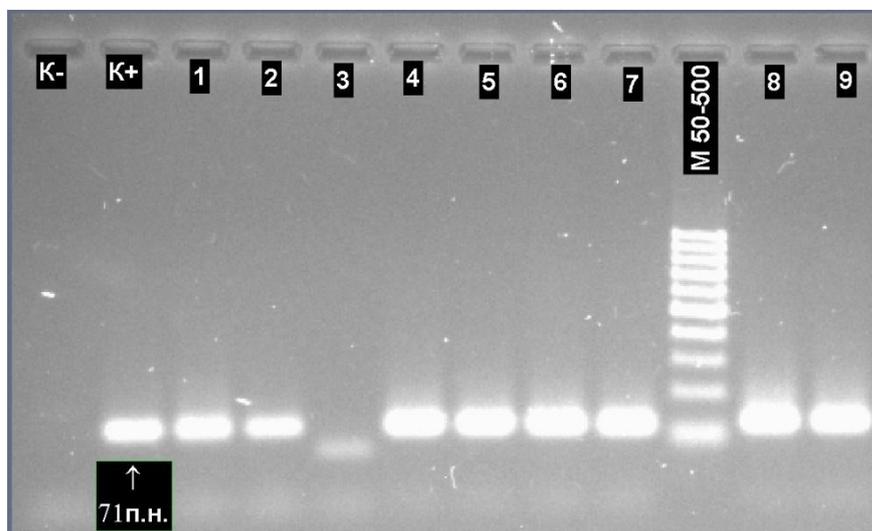


Рисунок 2 – Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов ТТМV

Как показано на рисунке 2, наличие зоны размером 71 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов ТТМV. Образцы № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 – являются «позитивными», в данных образцах обнаружена ДНК вирусов ТТМV. Образец № 3 – является «негативным», ДНК вирусов ТТМV не обнаружена. Для интерпретации результатов используют таблицу 8.

Таблица 8 – Интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования клинического материала с целью выявления ДНК вирусов ТТМV

Электрофоретическая детекция	Результат
наличие специфических полос размером 71 п.н.	Обнаружена ДНК вирусов ТТМV
отсутствие специфических полос размером 71 п.н.	Не обнаружена ДНК вирусов ТТМV

в отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны
---	------------------------------------

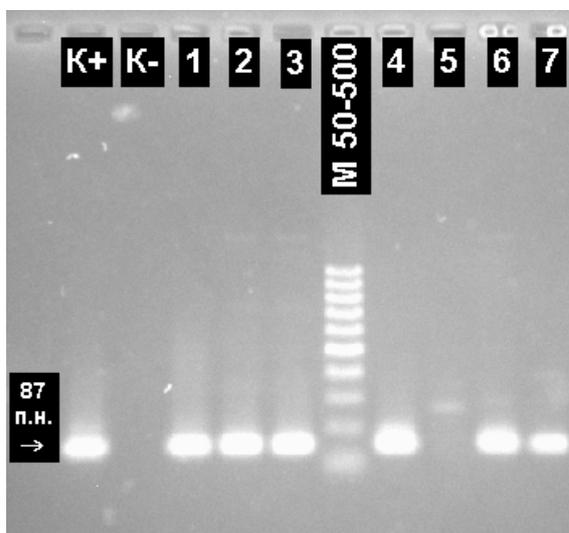


Рисунок 3 – Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов TTMDV

Как показано на рисунке 3, наличие зоны размером 87 п.н., свидетельствует о специфической амплификации фрагмента ДНК вирусов TTMDV. Образцы № 1, 2, 3, 4, 6, 7 – являются «положительными», в данных образцах обнаружена ДНК вирусов TTMDV. Образец № 5 – является «негативным», ДНК вирусов TTMDV не обнаружена. Для интерпретации результатов используют таблицу 9.

Таблица 9 – Интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования клинического материала с целью выявления ДНК вирусов TTMDV

Электрофоретическая детекция	Результат
наличие специфических полос размером 87 п.н.	Обнаружена ДНК вирусов TTMDV
отсутствие специфических	Не обнаружена ДНК вирусов TTMDV

полос размером 87 п.н.	
в отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны

## **6. Заключение**

Положительный результат при определении ДНК вирусов TTV, TTМV и TTMDV свидетельствует о статусе инфицированности обследуемого и, с учетом клинических данных, об этиологическом значении TTV при заболевании печени. Наличие TTV может утяжелять течение хронических вирусных гепатитов В и С, такие пациенты нуждаются в динамическом наблюдении. Выявление ДНК вирусов TTV у пациентов после трансплантации органов является дополнительным маркером иммуносупрессии и может служить для оценки риска развития инфекционных осложнений и острых отторжений трансплантатов.

## **7. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что, в свою очередь, приводит к неверной интерпретации и диагностике и, соответственно, неправильно подобранной терапии, что в конечном итоге может нанести вред пациенту.

Причины появления ложноположительных результатов: контаминация исследуемых образцов различными биологическими агентами вирусной, бактериальной или иной природы, перекрестная

контаминация от образца к образцу, загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при проведении выделения ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Параллельно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация, отсутствие или наличие небольшого количества исследуемой ДНК в пробах, или образцах выделенных нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, неисправность оборудования, наличие ингибиторов ПЦР, несоблюдение технологии внесения образцов ДНК в пробирку на этапе амплификации, а также несоблюдение технологии внесения ампликонов в гель, что приводит к их вымыванию во время электрофореза.

Сотрудники, проводящие исследования, должны неукоснительно соблюдать методические инструкции и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.

## **Обоснование целесообразности практического использования метода молекулярно-генетической диагностики ТТ-вирусной инфекции**

Сообщение японских исследователей о новом ДНК-содержащем вирусе, который был выделен от пациентов с посттрансфузионным гепатитом неизвестной этиологии, появилось в 1997 году. Этот вирус получил название ТТV – transfusion-transmitted virus (вирус, передающийся при переливании крови), а также Torque teno virus (крученное ожерелье, браслет), так как геном ТТV состоит из кольцевой одноцепочечной молекулы ДНК размером около 3800 нуклеотидов [0]. ТТV наиболее часто определяется в сыворотке крови, кроме того, он обнаружен в слюне, смывах из ротоглотки, грудном молоке, семенной жидкости, вагинальных выделениях, фекалиях [2].

Установлена широкая распространенность ТТV среди населения многих регионов мира, которая делает ТТV фактически вездесущим, следовательно, существуют механизмы уклонения данных вирусов от иммунной системы. На сегодняшний день нет единого мнения о патогенности ТТV. С момента открытия вируса проводились исследования ассоциации с различными заболеваниями, такими как гепатит, рак, гематологические и аутоиммунные расстройства, однако прямых доказательств наличия взаимосвязи пока не обнаружено [3]. В последние годы появился ряд публикаций о том, что репликация ТТV отражает функциональность иммунной системы. Уровень ДНК ТТV в сыворотке резко возрастает у пациентов, перенесших трансплантацию органов, предположительно в результате иммуносупрессии [4]. Имеются исследования о связи уровня виремии ТТV с риском отторжения трансплантата сердца и легких. Обсуждается возможность применения ТТV в качестве биомаркера для определения состояния иммуносупрессии у пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, для оценки риска инфекционных осложнений и острых отторжений [5,6,7]. Появились сообщения об ассоциации ТТV с сахарным диабетом 2 типа и раком молочной железы [88].

Также изучается связь генетических дефектов врожденного иммунитета и величины вирусной нагрузки ТТV.

Обнаружение в течение длительного времени ДНК ТТV в сыворотке крови на фоне сохранных показателей морфофункциональной целостности печени указывает на существование бессимптомного носительства. В то же время показано, что наличие ТТV осложняет течение хронического вирусного гепатита С, ускоряет прогрессирование фиброза печени, чаще приводит к развитию гепатоцеллюлярной карциномы [9]. Также была отмечена значимая связь тяжести заболевания печени с выявлением ТТV как в виде моноинфекции, так и ко-инфекции с вирусом гепатита В, у пациентов с циррозом, которым проводилась трансплантация печени [10].

Таким образом, изучение ТТV с целью выявления особенностей сочетанных инфекций (микст-инфекций), клинические особенности которых недостаточно полно отражены в литературе является перспективным и даст возможность оценить его совокупный патогенный потенциал.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Nishizawa T, Okamoto H., Konishib K, Yoshizawac H, Miyakawad Y, Mayumi M. 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.
2. Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol.* 1999 Aug;13(3):181-184. doi: 10.1016/S1386-6532(99)00015-3.
3. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihăescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch Virol.* 2015 Apr;160(4):893-908. doi: 10.1007/s00705-015-2363-9.
4. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Jul;22(7):589–593 doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.007.

5. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013 Nov; 155: 1178–1187. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.034.
6. Nordén R, Magnusson J, Lundin A, Tang KW, Nilsson S, Lindh M, Andersson LM, Riise GC, Westin J. Quantification of Torque Teno Virus and Epstein-Barr Virus is of limited value for predicting the net state of immunosuppression after lung transplantation. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Apr;5(4). doi: 10.1093/ofid/ofy050.
7. Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F et al. Torque teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis*. 2014 Jan;209(2):247–254 doi: 10.1093/infdis/jit423.
8. [Spandole-Dinu S](#), [Cimponeriu DG](#), [Crăciun AM](#), [Radu I](#), [Nica S](#), [Toma M](#), [Alexiu OA](#), [Iorga CS](#), [Berca LM](#), [Nica R](#). Prevalence of human anelloviruses in Romanian healthy subjects and patients with common pathologies. *BMC Infect Dis*. 2018 Jul;18(334). doi: 10.1186/s12879-018-3248-9.
9. Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H. High TT-virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol*. 2002 Aug;67(4):501-509. doi: 10.1002/jmv.10129.
10. Kazemi MJ, Yaghobi R, Iravani Saadi M, Geramizadeh B, Moayedi J. Association between TT virus infection and cirrhosis in liver transplant patients. *Hepat Mon*. 2015 Sep;15(9): e28370. doi: 10.5812/hepatmon.28370.