

45

**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 ТТВ (*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 1л;
- 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 ТТV 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-cggcaccgcccct-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
TTVccgaatggctgagttttccacgcccgtccgcagcgggtaagccacggagggagatcagcgcgtcccga
ggcggggtgccggaggtgagtttacacaccgcagtcaaggggc;

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

– 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'-gccccttgactbcgggt-3', ttv-зонд-HEX-
cggcaccccgccct-MGB;

– праймеры и зонды для выявления ДНК внутреннего контрольного
образца (ВКО): ВКО-прямой-5'-gtcgcggtaattggcgc-3', ВКО-обратный-5'-
ggccacgtgtttgatcga-3', ВКО-зонд-5'-FAM-atcttcgtttagggcaagatcggcacaggcca-
BHQ1-3', ВКО-стандарт5'-ggccacgtgtttgatcgaactttcgatcttcgtttagggcaagat-
cggcacaggccagcccggccggaccggcgccaattaccgcgac-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 ТТV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках

Состав смеси для проведения ПЦР при выявлении ТТV в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках: деионизированная вода, ПЦР-смесь, праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК ТТV 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 искомого 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 ТTV)
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 R² должен быть больше 0,99) . При значениях указанных параметров близких к оптимальным используют полученные количественные значения (копии ДНК ТТV, копии ДНК ВКО) для расчета вирусной нагрузки ДНК ТТV в биологических образцах.

4.5 Проведение расчета вирусной нагрузки ТТV

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 ТТV не выявлена или присутствует в концентрации ниже 500 копий/мл. Диапазон количественной оценки набора составляет 1500 копий/мл – 10⁸ копий/мл. Если результат меньше, чем 1500 копий/мл, то он интерпретируется как результат менее 1500 копий ДНК ТТV/мл. Если результат больше, чем 10⁸ копий/мл, то он интерпретируется как результат более 10⁸ ДНК ТТV/мл.

4.5.2 Расчет вирусной нагрузки ТТV 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 (10⁵) – который широко используется при количественной оценке ДНК вирусов в пробах ДНК при экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов. Коэффициент пересчета: 10⁵ клеток = 2x10⁵ геномов человека.

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

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

4.6 Принятие управленческого решения

При выявлении TTV и определении вирусной нагрузки TTV устанавливают диагноз «В33.8 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.