

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**Метод молекулярно-генетической диагностики
ГТ-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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
30.11.2018
Регистрационный № 122-1118

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТТ-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «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 ТТВ (Transfusion-transmitted virus, Torque teno virus), ТТМВ (Torque Teno mini virus), ТТМДВ (Torque teno midi virus). В основе метода — полимеразная цепная реакция (ПЦР) в формате nested (гнездовой) с электрофоретической детекцией.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение наличия вирусов видов ТТВ, ТТМВ, ТТМДВ при острых и хронических заболеваниях печени, 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Изделия медицинской техники для пробоподготовки и выделения ДНК:

- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.
- Высокоскоростная термостатированная центрифуга, 10000-15000×g, диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С.
- Твердотельный термостат, диапазон температур от -10 до +99 °С.
- Микроцентрифуга-вортекс.
- Насос с колбой-ловушкой.
- Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10, 10-100; 100-1000 мкл).
- Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки нуклеиновых кислот.
- Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С.
- Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С.
- УФ-стерилизатор или его аналог.

Изделия медицинской техники для ПЦР

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

Изделия медицинской техники для электрофоретической детекции

- Дозатор пипеточный (0,5-10 мкл).
- Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С.
- Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С.

- Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров.

- УФ-трансиллюминатор.

- Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером.

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, амплификации, проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле. Перечень основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использованием коммерческих наборов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острые и хронические заболевания печени вирусной этиологии (МКБ-10 коды B15-B19), включая хронический вирусный гепатит неуточненный (МКБ-10 код B18.9), болезни печени другой этиологии (МКБ-10 коды K70-K77), наличие трансплантированных органов и тканей (МКБ-10 код Z94).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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

Этапы:

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

Экстракция ДНК. ДНК можно выделить с использованием готовых коммерческих наборов.

ПЦР. Выявление ДНК изучаемых вирусов проводят методом ПЦР в формате nested с применением праймеров для консервативного региона. Структура праймеров и программа для ПЦР приведены в таблицах 1 и 2 соответственно. Для 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	YCTWGCCCCGAATTGCCCT

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

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	35
Отжиг	55	30 с	
Элонгация	72	30 с	
Элонгация	72	7 мин	1
Охлаждение	4	3 мин	1

Для второго раунда ПЦР использованы ампликоны, полученные в результате первого раунда. Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью 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	CCCCTTGACTBCGGTGTGTAА

Таблица 4. — Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTMV

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

Таблица 5. — Структура праймеров для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTMDV

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

Программа для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTV, TTMV и TTMDV приведена в таблице 6.

Таблица 6. — Программа для второго раунда ПЦР с целью выявления ДНК TTV, TTMV и TTMDV

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	25
Отжиг	55	30 с	
Элонгация	72	30 с	
Элонгация	72	7 мин	1
Охлаждение	4	3 мин	1

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.

Интерпретация результатов ПЦР осуществляется по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (K-), не должно быть никаких полос. Если в отрицательном контроле (K-) 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 (TTV+, TTMV+ и TTMDV+), 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 (K-) можно использовать бидистиллированную воду, в качестве положительного контроля — 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.

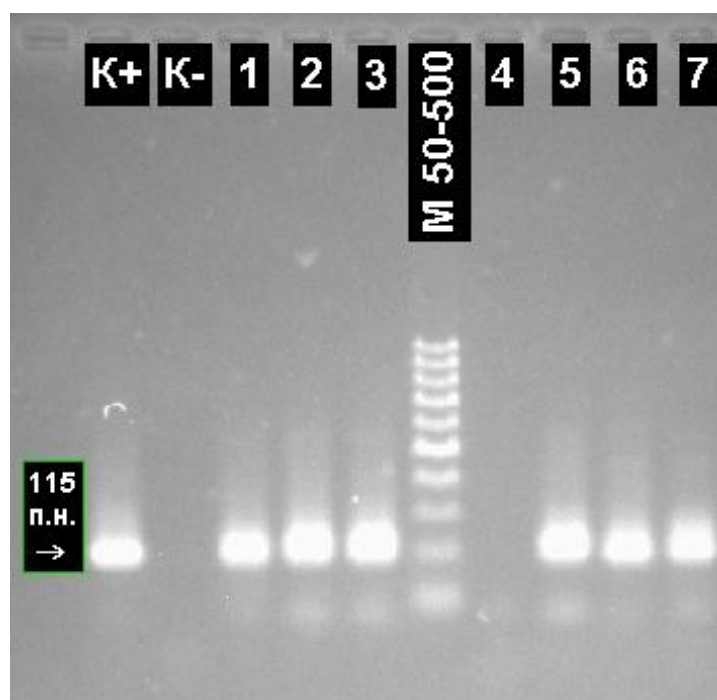


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов TTV

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 них обнаружена ДНК вирусов TTV. Образец № 4 — «негативный», 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 TTV
В отрицательном контроле (K-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны

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

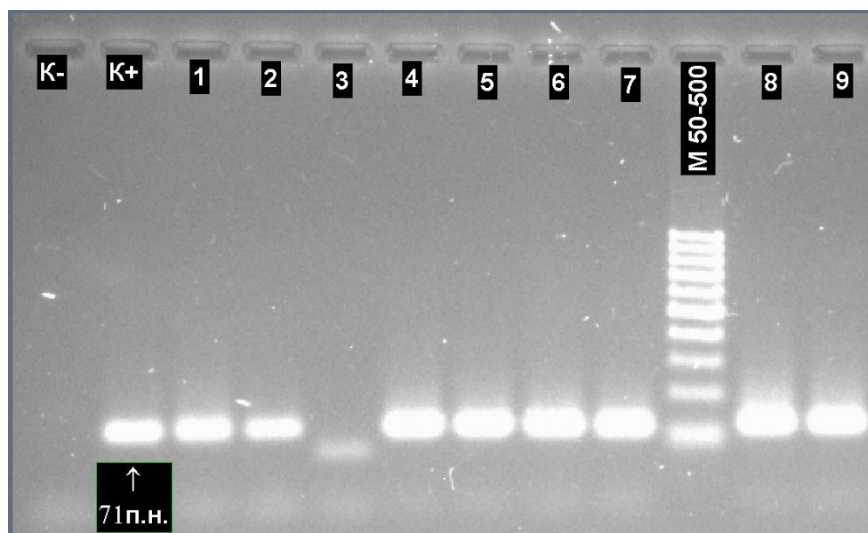


Рисунок 2. — Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов TTMV

Таблица 8. — Интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования клинического материала с целью выявления ДНК вирусов TTMV

Электрофоретическая детекция	Результат
Наличие специфических полос размером 71 п.н.	Обнаружена ДНК вирусов TTMV
Отсутствие специфических полос размером 71 п.н.	Не обнаружена ДНК вирусов TTMV
В отрицательном контроле (K-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны

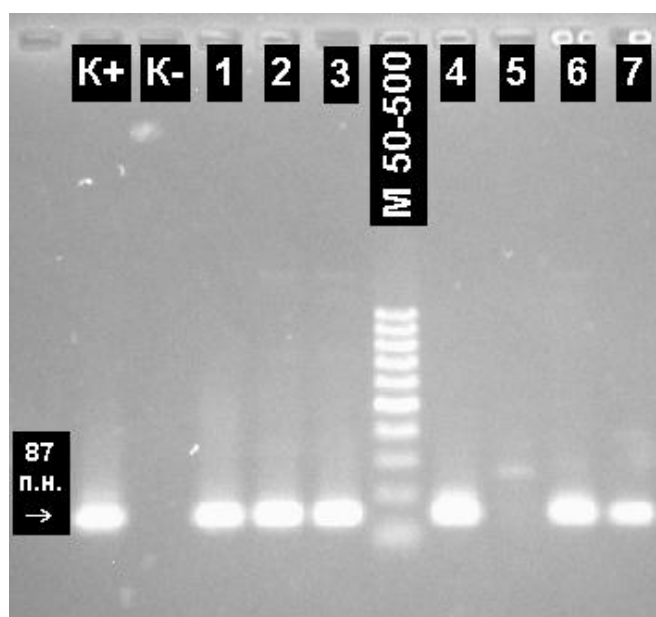


Рисунок 3. — Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов ДНК вирусов TMDV

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 — «негативный», 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 полос размером 87 п.н.	Не обнаружена ДНК вирусов TTMDV
В отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы	Результаты анализа недействительны

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Положительный результат при определении ДНК вирусов TTV, TTMV 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; пациенты нуждаются в динамическом наблюдении. Выявление ДНК вирусов TTV у пациентов после трансплантации органов является дополнительным маркером иммуносупрессии и может служить для оценки риска инфекционных осложнений и острого отторжения трансплантатов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Молекулярно-генетическое исследование подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил вызывает возникновение 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 выделении ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Параллельно с

опытными образцами в каждом эксперименте должен использоваться специальный контроль, позволяющий верифицировать результаты.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация, отсутствие либо 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 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 г. Этот вирус получил название ТТV – transfusion-transmitted virus (вирус, передающийся при переливании крови), а также Torque teno virus (крученое ожерелье, браслет), так как геном ТТV состоит из кольцевой одноцепочечной молекулы ДНК размером около 3800 нуклеотидов. ТТV наиболее часто определяется в сыворотке крови, кроме того, он обнаружен в слюне, смывах из ротоглотки, грудном молоке, семенной жидкости, вагинальных выделениях, фекалиях.

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 проводило изучение ассоциации с различными заболеваниями, такими как гепатит, рак, гематологические и аутоиммунные расстройства, однако прямых доказательств взаимосвязи пока не обнаружено. 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. 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. Появились сообщения об ассоциации ТТV с сахарным диабетом 2 типа и раком молочной железы. Также изучается связь генетических дефектов врожденного иммунитета и величины вирусной нагрузки ТТV.

Обнаружение в течение длительного времени ДНК ТТV в сыворотке крови на фоне сохраненных 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. Также была отмечена значимая связь тяжести заболевания печени с выявлением ТТV как в виде моно-, так и ко-инфекции с вирусом гепатита В, у пациентов с циррозом, которым производилась трансплантация печени.

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