

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК TORQUE TENO VIRUS

*Воропаев Е. В.¹, Осипкина О. В.¹, Воропаева А. В.²,
Рымко А. Н.³, Акалович С. Т.³, Мицура В. М.^{1,2}, Шевченко Н. И.²*

¹*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
Гомель, Республика Беларусь,*

²*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной
медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь,*

³*ООО «АртБиоТех», Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Torque teno virus (TTV) — безоболочечный, одноцепочечный ДНК-вирус принадлежащий к семейству Anelloviridae. Согласно литературным данным, широко распространен среди населения, частота встречаемости варьирует в разных популяциях и географических регионах. Не доказана связь TTV ни с одним конкретным заболеванием человека, существует предположение, что этот вирус является одним из основных компонентов человеческого виroma. В последние годы растет число исследований, в которых TTV изучается как маркер иммунного статуса человека среди различных групп пациентов с ослабленным иммунитетом. Процесс изучения особенностей вируса осложнен отсутствием стандартизованных методов обнаружения. Разработанный метод мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием оригинальных специально подобранных олигонуклеотидных праймеров и молекулярных зондов, состава реакционной смеси и программы амплификации позволяет проводить выявление и количественное определение ДНК TTV человека в образцах биологического материала.

Ключевые слова: Torque teno virus, количественная оценка, полимеразная цепная реакция, лабораторная диагностика.

Введение. Семейство вирусов Anelloviridae (Анелловирусы) инфицирует широкий спектр видов млекопитающих. У человека были идентифицированы три рода этого вирусного семейства: Alphatorquevirus, Betatorquevirus и Gammatorquevirus, которые включают 26, 38 и 15 видов соответственно, каждый из которых обладает генетическим разнообразием [1]. Капсид этих вирусов икосаэдрический, нуклеокапсид не имеет липидной оболочки, геном представляет собой кольцевую одноцепочечную ДНК с отрицательной полярностью размером от ~2,0 до 3,9 килобаз (кб), а общий диаметр частиц составляет около 18–30 нм [2]. TTV относится к Alphatorquevirus. Таксономия Anelloviridae регулярно обновляется, согласно Международному комитету по таксономии вирусов, все названия видов приводят в биномиальном формате, таким образом, Alphatorquevirus homin 1 — новое название вида Torque teno virus 1.

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

Роль TTV в развитии тех или иных заболеваний до сих пор является предметом дискуссий. Ввиду широкой его распространенности, в том числе и среди здоровых людей, существует вероятность коинфекции с другими вирусами, ряд исследований посвящены изучению этого вопроса. В последние годы растет число работ, в которых TTV изучается как маркер иммунного статуса человека среди различных групп пациентов с ослабленным иммунитетом. Например, в последнее десятилетие проведено немало исследований по использованию неинвазивных биомаркеров при трансплантации почек и печени, и TTV был использован в качестве биомаркера иммуносупрессии, поскольку количество копий вируса в периферической крови может отражать интенсивность иммуносупрессии [4, 5]. При проведении такого рода исследований большое значение имеет не только выявление вируса, но и количественная оценка вирусной нагрузки.

TTV выявляют с помощью разных форматов ПЦР: стандартная, гнездовая ПЦР (nested-PCR), ПЦР в реальном времени (real-time PCR), однако методы выявления не стандартизированы. Вследствие высокой генетической гетерогенности генома TTV выявление зависит от использованных праймеров, биологического материала. Как правило, при изучении TTV исследователи вынуждены разрабатывать и использовать собственные тест-системы (in-house тест-системы) для выявления данного вируса и его количественной оценки, работы в этом направлении ведутся и в Республике Беларусь [6].

При разработке таких тест-систем нужно учитывать ряд требований, таких как выбор биологического материала, его отбор и хранение; экстракция нуклеиновых кислот; подбор праймеров, зондов, контролей и калибраторов; условия проведения ПЦР; определение эффективности анализа (эффективность амплификации, коэффициент корреляции, предел обнаружения и так далее). Так, при подборе праймеров для выявления TTV необходимо учесть, что геном TTV состоит из кодирующего и некодирующего регионов (UTR). Кодирующий регион включает несколько открытых рамок считывания и является переменным, поэтому его использование для проведения ПЦР приводит к снижению частоты выявления, в отличие от более стабильного некодирующего. Для увеличения аффинности к мишени и биостабильности в праймерах и зондах для ПЦР применяют LNA-модификации (locked nucleic acid). LNA-модификации, увеличивая температуру плавления олигонуклеотида на 2–4 °С, улучшают эффективность гибридизации с мишенью за счет формирования фиксированной конформации углеводного фрагмента, образованного метиленовым мостиком между атомом кислорода в 2'-положении и углеродом в 4'-положении.

Несмотря на быстрое накопление знаний о TTV и других анелловирусах, многие вопросы остаются нерешенными, а их значение для здоровья человека остается неизвестным. Распространено мнение о непатогенности Anelloviridae, одним из подтверждений которого является факт их высокой представленности в виrome человека, широкого распространения, «вездесущести». Однако патогенность некоторых вирусов была доказана спустя продолжительное время после их открытия, и такая вероятность существует и в отношении TTV [7].

Цель работы – разработать метод для выявления и количественного определения ДНК TTV человека в биологическом материале на основе ПЦР и в реальном времени.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет».

В качестве биологического материала для отработки метода использовали лейкоцитарную массу периферической крови пациентов, находившихся на стационарном лечении в гематологическом отделении (ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь) по поводу злокачественных новообразований лимфоидной, кроветворной ткани (коды МКБ-10: C90–C92). Участники исследования (N=21, 38 % мужчин, медиана возраста [Q1; Q3] [min; max] 64 года [42; 73] [19; 87]) являлись жителями Гомеля или Гомельской области, были информированы о целях исследования и предстоящих процедурах (получено информированное письменное согласие).

Для выявления и количественного определения ДНК ТТV человека использован метод, основанный на ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией, во время которой флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, что приводит к нарастанию интенсивности флуоресценции. Накопление специфического продукта амплификации регистрируют путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала.

Выявление и определение количества ДНК ТТV включало 2 этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и мультиплекс-ПЦР (одновременная амплификация) консервативного некодирующего участка ДНК ТТV и участка ДНК β-глобинового гена человека, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля, что позволяет контролировать адекватность взятия биологического материала, его хранения, экстракции и амплификации. β-глобиновый ген является участком генома человека, должен присутствовать в образце в количестве, эквивалентном количеству клеток (10^3 – 10^5 геномов).

Экстракцию нуклеиновых кислот из образцов биологического материала проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» («Амплисенс» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) 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>), Primer3Plus

(<https://www.primer3plus.com/index.html>). Синтез праймеров и зондов осуществлен в ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь).

Нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления ДНК ТТV:

ttv-прямой-5'-
CC[+G]AATG[+G][+C]TGAGTT-3' ([+N] — LNA-модификация),
ttv-обратный-5'-GCCCCtGACtBCGGt-3',
ttv-зонд-HEX-CGGCACCCGCCCT-MGB.

Нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления участка ДНК β-глобинового гена человека:

β-глобин-F-5'-
TGCACGTGGATCCTGAGAACT-3',
β-глобин-R-5'-
AATTCTTTGCCAAAGTGATGGG-3',
β-глобин-зонд-5'-FAM-
CACCCACCCAGCAAGGACACTG-BHQ1-3'.

В качестве положительного контроля и для проведения количественной оценки использованы ДНК-калибраторы (K1, K2, K3, K4, K5) — синтетические фрагменты, содержащие вставки 5-UTR области ДНК ТТV и участка ДНК β-глобинового гена человека, с разными концентрациями (K1 — 10^3 копий/мл, K2 — 10^4 копий/мл, K3 — 10^5 копий/мл, K4 — 10^6 копий/мл, K5 — 10^7 копий/мл). ДНК-калибраторы используются для построения калибровочной прямой для обеих ПЦР: амплификации участка ДНК ТТV и участка ДНК β-глобинового гена, а также в качестве положительных контролей.

Проведение реакции амплификации, анализ и учет результатов проводили при помощи амплификатора Rotor Gene Q (QIAGEN, Германия).

Статистический анализ проведен с использованием программы Statistica 12.0. Количественные показатели оценивали на соответствие нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка, описательная статистика данных, распределение которых не соответствовало нормальному, приведена в виде медианы и размаха (минимальное и максимальное значения, интерквартильный размах).

Результаты и их обсуждение. Сконструирована in-house тест-система в формате мультиплекс для референсного и таргетного участков ДНК, использованы реагенты производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). С учетом использования оригинальных олигонуклеотидов проведен подбор условий амплификации мультиплексной ПЦР.

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 (TTV) и FAM/Green (β -глобин). Состав амплификационной смеси (общий объем — 30 мкл): деионизированная вода, 3x премикс Art-Mix ДНК-полимераза, 25 мМ dНТФ, праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК TTV и β -глобинового гена человека, ДНК анализируемого образца. В каждую постановку включали анализируемые образцы, калибраторы и отрицательный контрольный образец.

В качестве отрицательного контрольного образца использован буферный раствор, не

содержащий искомые ДНК, прошедший все этапы пробоподготовки.

Полученные данные (кривые накопления флуоресцентного сигнала) анализировали с помощью программного обеспечения используемого амплификатора, установка настроек проведена в соответствии с инструкцией. Интерпретация построена на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (значение Ct). Данные считаются валидными, если получены правильные результаты для контролей (представлены в таблице 1).

Таблица 1 — Результаты для контролей

Контроль	Контролируемый этап анализа	Значение порогового цикла (Ct) по каналу FAM/Green	Значение порогового цикла (Ct) по каналу HEX/Yellow
K1, K2, K3, K4, K5	ПЦР, экстракция	Определено	Определено
K-	ПЦР, экстракция	Отсутствует	Отсутствует

Для калибраторов K1, K2, K3, K4, K5 должны детектироваться характерные кинетические кривые по каждому из каналов (FAM/Green и HEX/Yellow). Кривые накопления флуоресцентного сигнала калибраторов по каналам FAM/Green и HEX/Yellow приведены для примера на рисунках 1 и 2.

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.

Для построения калибровочной прямой вносят концентрации калибраторов, проводят

оценку наклона, величины амплификации (E) и коэффициента корреляции (R^2), оптимальные значения составляют — 3,322, 1 (100 %) и 0,99, соответственно.

При получении значений параметров, близких к оптимальным, можно использовать количественные значения для расчета вирусной нагрузки ДНК TTV в биологических образцах. Калибровочные прямые для анализа по каждому из каналов (FAM/Green и HEX/Yellow) приведены для примера на рисунках 1 и 2.

Аналитическая специфичность разработанных олигонуклеотидов и зондов определена *in silico* с помощью программного приложения BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Аналитическая чувствительность метода — наименьшее количество вещества (LOD — limit of detection, предел детекции), которое можно выявить с уровнем достоверности 95 % без точного количественного определения, оценена с использованием серии разведений и составила 500 копий/мл.

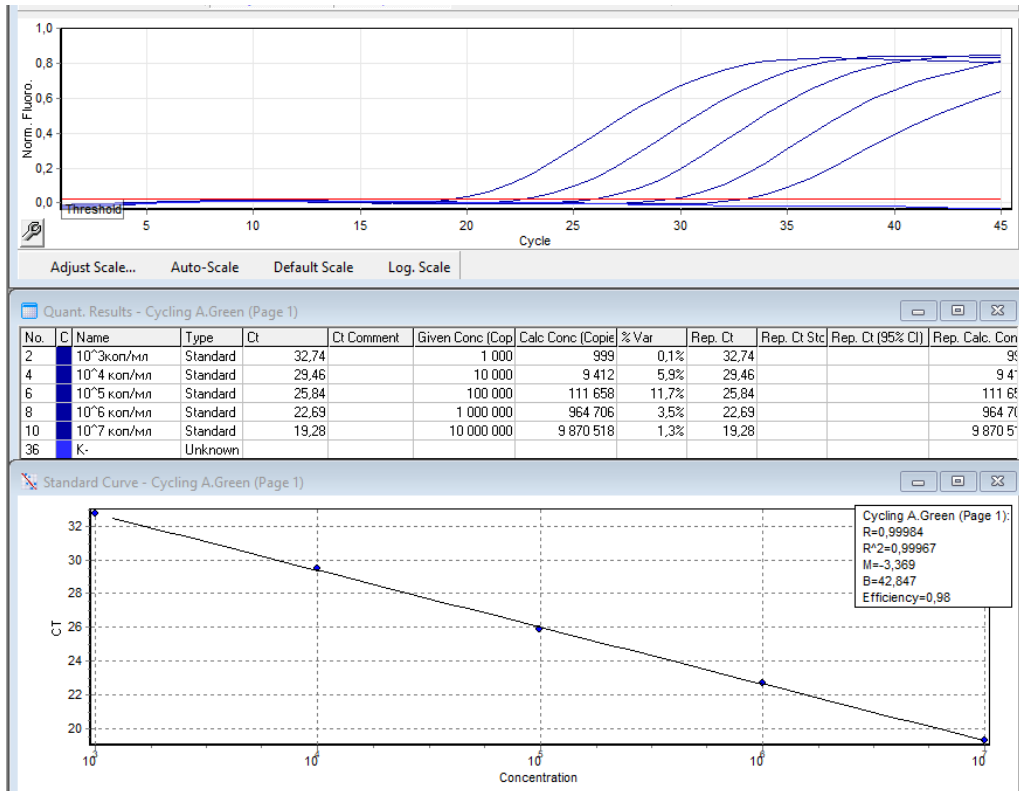


Рисунок 1 – Кривые накопления флуоресцентного сигнала калибраторов (K1 — 10³ копий/мл, K2 — 10⁴ копий/мл, K3 — 10⁵ копий/мл, K4 — 10⁶ копий/мл, K5 — 10⁷ копий/мл) и калибровочная прямая, анализ по каналу FAM/Green

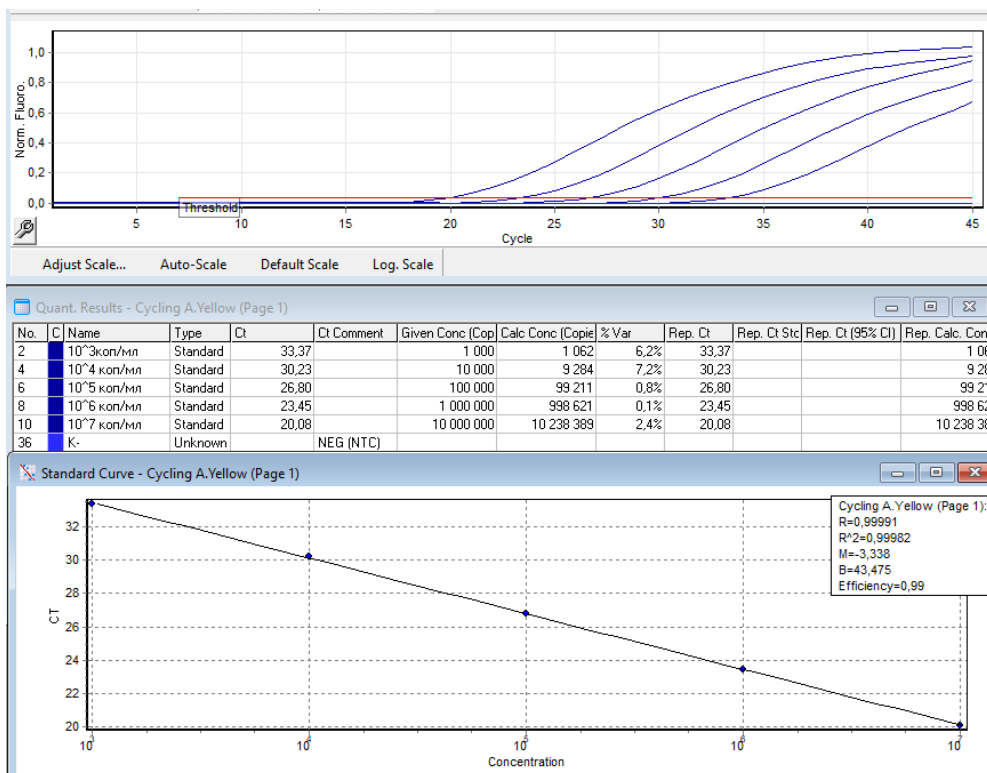


Рисунок 2 – Кривые накопления флуоресцентного сигнала калибраторов (K1 — 10³ копий/мл, K2 — 10⁴ копий/мл, K3 — 10⁵ копий/мл, K4 — 10⁶ копий/мл, K5 — 10⁷ копий/мл) и калибровочная прямая, анализ по каналу HEX/Yellow

Для количественного теста расчет концентрации выражен в формате «логарифм копий ДНК искомого вируса на стандартное количество клеток человека (10^5)», который широко используется при количественной оценке ДНК вирусов в пробах ДНК при экстракции тотальной ДНК из

цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов (приведен в инструкциях по применению наборов, например «АмплиСенс», Российская Федерация). Коэффициент пересчета: 10^5 клеток = 2×10^5 геномов человека.

Формула для расчета вирусной нагрузки TTV:

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

В результате проведения мультиплекс-ПЦР определены наличие ДНК TTV и его вирусная нагрузка в образцах биологического материала (лейкоцитах крови) у пациентов группы исследования. ДНК TTV выявлена у 81 % (17) пациентов группы исследования, медианное значение (median [Q1; Q3] [min; max]) вирусной нагрузки lg (копий ДНК TTV/ 10^5 клеток) в лейкоцитах крови составило 3,04 [2,23; 4,47] [1,67; 8,75]).

Заключение. Подобраны оригинальные праймеры и TaqMan-зонды, сконструирована in-house тест-система в формате мультиплекс для

референсного и таргетного участков ДНК, подобран состав реакционной смеси, программа амплификации, алгоритм учета и анализа данных для выявления и количественного определения ДНК TTV человека. Разработанный метод мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием оригинальных специально подобранных олигонуклеотидных праймеров и молекулярных зондов, состава реакционной смеси и программы амплификации позволяет проводить выявление и количественное определение ДНК TTV человека в образцах биологического материала.

Список цитированных источников

1. Virus Taxonomy: 2023 Release International Committee on Taxonomy of Viruses [Electronic resource]. – Mode of access: <https://ictv.global/taxonomy>. – Date of access: 20.08.2024.
2. The mysterious anelloviruses: investigating its role in human diseases / M. Sabbaghian [et al.] // BMC Microbiol. – 2024. – Vol. 24. – Art. 40.
3. TTV and other anelloviruses: The astonishingly wide spread of a viral infection / P. G. Spezia [et al.] // Asp. Mol. Med. – 2023. – Vol. 1.
4. Gupta, G. Biomarkers in Kidney Transplantation: A Rapidly Evolving Landscape / G. Gupta, A. Athreya, A. Kataria // Transplantation. – 2024. – July 18.
5. Mrzljak, A. Torque teno virus in liver diseases and after liver transplantation / A. Mrzljak, T. Vilibic-Cavlek // World J. Transplant. – 2020. – Vol. 10, N 11. – P. 291–296.
6. Тест-система для проведения ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ДНК TTV в биологическом материале / В. М. Семенов [и др.] // Гепатология и гастроэнтерология. – 2024. – Т. 8, № 1. – С. 36–41.
7. Focosi, D. The Emerging Tool of the Human Anellovirome / D. Focosi, P. G. Spezia, F. Maggi // Viruses. – 2024. – Vol. 16, N 6. – Art. 990.

Molecular genetic method for the quantification of Torque Teno Virus DNA

*O. V. Osipkina¹, E. V. Voropaev¹, A. V. Voropaeva², A. M. Rymko³, S. T. Akalovich³,
V. M. Mitsura², N. I. Shevchenko²*

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

*²Republican Research Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic
of Belarus.*

³ArtBioTech LLC, Minsk, Republic of Belarus

Torque teno virus (TTV) is a non-enveloped, single-stranded DNA virus belonging to the family Anelloviridae. According to the literature, it is widespread in the population, with incidence varying in different populations and geographical regions. TTV has not been proven to be associated with any specific human disease; there is a suggestion that this virus is a major component of the human virome. In recent years, a growing number of studies have examined TTV as a marker of human immune status among different groups of immunocompromised patients. The process of studying the features of the virus is complicated by the lack of standards based detection methods. A multiplex real-time-PCR analysis has been developed by using original specially selected oligonucleotide primers and molecular probes, reaction mixture composition and amplification program for the detection and quantitative assessment of human TTV DNA in biological material samples.

Keywords: Torque teno virus, quantification, PCR, laboratory diagnosis.

Поступила 05.06.2024