



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Лаборатория по вирусология**



**Калина Август Шишкова**

**Разпространение и генетично разнообразие на  
Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,  
по професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Вирусология)**

**Научен ръководител:**

**Професор, д-р Златко Кълвачев, д.м.н.**

**София, 2014**

**Дисертационният труд е написан на 87 страници и съдържа 16 фигури и 15 таблици. Библиографската справка обхваща 126 литературни източника.**

**Защитата на дисертационния труд ще се състои на                    от            часа в заседателната зала на Биологически факултет на Софийския университет „Св. Кл. Охридски“, бул. Драган Цанков“ №8.**

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**

**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Лаборатория по вирусология**

**Калина Август Шишкова**

**Разпространение и генетично разнообразие на  
Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,  
по професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Вирусология)**

**Научен ръководител:**

**Професор, д-р Златко Кълвачев, д.м.н.**

**София, 2014**

**Дисертационният труд е обсъден и приет на разширено заседание на Лабораторния съвет на Лаборатория „Вирусология“, Биологически факултет на Софийския университет „Св. Кл. Охридски“.**

**Дисертационният труд е разработен в Центъра за диагностика на вируси и вирози на Военномедицинска академия и в Лаборатория „Вирусология“ на Биологически факултет на СУ “Св. Кл. Охридски“**

## СЪКРАЩЕНИЯ

**TTV** - Torque Teno virus

**TTMV** - Torque teno mini virus

**TTMDV** - Torque teno midi virus

**PBMC** (peripheral blood mononuclear cells) – периферни кръвни мононуклеарни клетки

**HCV** – Хепатитен вирус С

**NF-kB** - ядрен транскрипционен фактор

**TAIP** (TTV- derived apoptosis-inducing protein) – протеин синтезиран от някои генотипи на TTV, който индуцира апоптозата

**TLR9** (Toll-Like Receptor – 9) – Трансмембранен протеин. Играе роля в разпознаването на патогените и инициирането на първичен имунен отговор

**ORF** – отворена рамка за четене – нуклеотидните последователности намиращи се между инициращия и терминалния кодон

**ЦНС** – централна нервна система

**dNTP** – дезокси нуклеотид трифосфат

**IL** – interleukin, молекула медиатор на възпалението при имунна реакция на организма

**CAV** (Chicken Anemia Virus) – Вирус на птичата анемия

**HBV** – Хепатитен вирус В

**ТАТА бокс** – промоторен елемент с нуклеотидна последователност ТАТА, който се намира в близост до инициращия кодон

**UTR** – Нетранслируем регион

**ПНС** – Периферна нервна система

**PCR** (Polymerase Chain Reaction) – полимеразна верижна реакция

**нд** - нуклеотид

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

През 1997 г. е изолиран нов ДНК вирус от серум на пациент с пост-трансфузионен хепатит с неизвестна етиология. Вирусът е наречен ТТ вирус във връзка с инициалите на пациента, от който е изолиран (Nishizawa et al., 1997; Okamoto et al., 1998). Новооткритият вирус е класифициран в семейство Anelloviridae (Biagini et al., 2005). През 2005 г. е открит Torque Teno Mini вирус, който е наречен така поради факта, че геномът му притежава известно сходство с този на ТТВ, но е значително по-къс (Takahashi et al., 2000). Когато през 2007 г. е открит подобен вирус, отново във връзка с дължината на генома е наречен ТТМДВ (Ninomiya et al., 2007a). Геномът на този вирус е с дължина между дължините на геномите на ТТВ и ТТМВ. След филогенетичен анализ двата нови вируса са класифицирани съответно във втори и трети род на семейство Anelloviridae.

Представителите на семейството са класифицирани в 11 рода. Вирусите, които имат значение за човешката патология са представители на първите три рода. Останалите анеловируси атакуват примати, кучета, котки и селскостопански животни (Leary et al., 1999; Verschoor et al., 1999; Cong et al., 2000; Inami et al., 2000; Okamoto et al., 2000a, b, 2001b, 2002; Thom et al., 2003).

На база на генетичните различия между различните ТТВ изолати са регистрирани 39 генотипа с над 30% разлики в нуклеотидните последователности между тях и пет големи филогенетични групи с над 50% различия между представителите на отделните групи (Biagini et al., 2006; Biagini et al., 2005; Okamoto et al., 2004; Peng et al., 2002). Подобни разлики в генома са открити и при 13 изолата на ТТМВ – над 40%. Нуклеотидните секвенции са изследвани при 15 ТТМДВ изолата. Разликите между тях достигат 33% (Biagini et al., 2001; Biagini et al., 2005; Takahashi et al., 2000).

Новооткритите вируси са без суперкапсид, с кръгов едноверижен ДНК-ов геном с негативна полярност, две големи отворени рамки на четене (ORF1 и ORF2) и няколко по-малки (Bendinelli et al., 2001). Размерите на генома са съответно: 3.6-3.9 кб за ТТВ, 3.2 кб за ТТМВ и 2.8-2.9 кб за ТТМДВ.

Трите вируса - TTV, TTMV и TTMDV, инфектират голяма част от човешката популация. Предполага се, че TTV-ните инфекции са свързани с много и най-различни заболявания: белодробни, чернодробни, хематологични нарушения и рак. Все още няма категорични доказателства за пряката връзка между TTV-ните инфекции и специфичните клинични прояви на тези заболявания. Съществува и хипотеза, която предполага ключовата роля на човешките анеловируси в развитието на автоимунни реакции (Blasek et al., 2008).

Основната трансмисия на TT вирусите е по кръвен път. В потвърждение е и фактът, че разпространението на тези вируси сред човешката популация е значително по-широко в сравнение с останалите вируси предавани по кръвен път (Handa et al., 2000; Werno et al., 2000). Присъствието на вирусите във фекалии (Okamoto et al., 1998; Ross et al., 1999), слюнка (Ross et al., 1999) и кърма (Toyoda et al., 1999), предполага наличието и на други пътища на трансмисия освен парентералните. Доказано е присъствие на TT вирусни секвенции в проби от шийката на матката, което предполага потенциал за трансмисия по полов път (Paul et al., 2001).

Епидемиологията на TT вирусните инфекции все още не е добре изяснена. Масштабните епидемиологични проучвания са ограничени от липсата на надеждни серологични методи за детекция на TTV. До момента най-ефективните методи за детекция са PCR методите.

Усилията са насочени към търсене и развитие на молекулярно-диагностични системи за детекция и количествено определяне на пълния спектър от TT вирусни генотипи и групи в човешката популация, както и на методи за охарактеризиране на имунологичният отговор към анеловирусните инфекции.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

### **Цел.**

Целта на настоящия труд е проучване на разпространението и генетичното разнообразие на Torque teno вирусите (сем. Anelloviridae) в България.

### **Задачи.**

За постигане на дадената цел бяха набелязани следните задачи:

1. Избор на подходяща диагностична система за откриване на Torque teno вируси.
  - 1.1 Да се приложат и усъвършенстват разработени PCR системи за детекция на анеловируси в проби от различни групи хора.
  - 1.2 Избор на подходящи праймерни системи.
2. Проучване на разпространението на вирусите сред българското население.
  - 2.1 Подбор на различни групи клинично здрави хора и пациенти с различни заболявания.
3. Секвениране на фрагмент от вирусният геном, амплифициран от кръвни проби на лица от избрани групи.
4. Да се установят разпространените генетични форми на Torque teno вирусите в България.



### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Клинични материали.

Събрани и изследвани бяха общо 535 кръвни проби от клинично здрави индивиди на възраст между 20 и 45 години (кръводарители), както и от пациенти с различни заболявания на възраст между 20 и 75 години. Пробите дарителска кръв бяха предоставени от Центъра по Трансфузионна хематология на Военномедицинска академия. Кръвните проби от пациенти, страдащи от различни заболявания бяха получени от клиниките по гастроентерология, белодробни болести, хематология и неврохирургия на Военномедицинска академия, а пробите от бъбречно-трансплантирани пациенти бяха получени от клиниката по нефрология и трансплантации на МБАЛ „Александровска”, МУ-София. Всички материали бяха взимани и изследвани в съответствие с етичните изисквания за работа с пациенти и техни клинични материали. Разпределението на изследваните проби е представено на **таблица 1**.

**Таблица 1.** Кръвни проби от клинично здрави индивиди и пациенти с различни заболявания, включени в настоящото проучване.

No.	Кръвни проби от:	Брой
1	Кръводарители	270
2	Пациенти с регистриран вирусен хепатит В	67
3	Пациенти с първичен мозъчен тумор	23
4	Пациенти с респираторни заболявания	90
5	Пациенти с неизяснена патология	65
6	Бъбречно трансплантирани пациенти	20
	ОБЩО:	535

#### 3.2 ДНК екстракционни процедури.

Тъй, като в хода на лечението си, различните пациенти приемат различни медикаменти, някои от които могат да бъдат инхибиторни по отношение на PCR технологията, ние оценихме ефективността на различните методи за екстракция на ДНК, с цел избягване на фалшиво-отрицателни резултати. Подбрани бяха по 10 проби

от различните групи кръвни проби, като равни количества от тях бяха обработени с по 4 различни екстракционни техники: протеиназа-К/фенол/хлороформна екстракция и търговските набори DNAzol-BD, QIAamp DNA Blood Mini Kit и AquaPure при спазване на изискванията за работа с тях.

### **3.2.1. Изолиране на ДНК чрез стандартна протеиназа.**

#### **К/фенол/хлороформна екстракция.**

Предварително утаените кръвни клетки бяха промивани трикратно с PBS при нискооборотна центрофугиране. Получената клетъчна маса беше ресуспендирана в 200 µl буфер А (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 10mM EDTA) и към суспензията бяха добавяни 2 µl (10mg/ml) протеиназа К (Invitrogen, USA) и 8 µl 10% SDS (ApliChem, Germany). Така обработеният материал беше инкубиран на водна баня за 2h на 60°C. След пълно лизиране на клетките инкубирахме епруветките на загрята до 95°C водна баня в продължение на 10 минути за инактивиране на протеиназа К. Следващата стъпка беше добавяне на 200 µl лизисен буфер В (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.65 M NaCl; 10mM EDTA) и добро разбъркване. ДНК беше екстрахирана чрез обработка с равен обем (400 µl) фенол – хлороформ – изоамилов алкохол (25:24:1) и преципитирана с абсолютен алкохол – 70°, в продължение на 3-4 часа (Maniatis T. et al., 1982)

### **3.2.2. Екстракция с DNAzol-BD (Invitrogen, USA) – гуанидин-изо – тиоцианатен метод.**

Реагентът DNAzol-BD Е специално пригоден за екстрахиране на геномна ДНК от тотална кръв. Към 200µl тотална кръв бяха прибавяни 500 µl DNAzol-BD, като получения лизат беше подлаган на размесване на вортекс. Към тази смес бяха добавяни 200 µl изо-пропанол и отново беше размесвана. Получената смес от три компонента престояваше на стайна температура за 5 минути и беше центрофугирана за седиментация на 13000rpm в продължение на 6 минути. След отделяне на супернатантата получената утайка беше третирана отново с 500 µl DNAzol-BD. Сместа беше центрофугирана отново и супернатантата премахвана. Получената утайка беше изсушавана и рехидратирана в 20 - 50 µl дейонизирана вода.

### **3.2.3. Екстракция с QIAamp DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN, Stanford).**

Към 200µl тотална кръв бяха прибавяни 20 µl протеаза. Добавяни бяха 200 µl буфер AL и трите компонента бяха размесвани на вортекс за 15s. Следващата стъпка беше инкубация на 56<sup>0</sup>C за 10 минути. След центрофугиране бяха добавяни 200 µl етанол и сместа отново беше размесвана на вортекс за 15 сек. Всички компоненти внимателно бяха прехвърляни в QIAamp Mini spin column (специалната колона с контейнер от кита с цел отделянето на ДНК от досега използваните буфери) и центрофугирани на 8000rpm в продължение на 1 минута. При това ДНК остава прикрепена към колоната, а течността с буферите и лизираните клетки остават в течната фракция, отделяща се в контейнера под колоната, и се изхвърля заедно с него. Останалата прикрепена към колоната ДНК остава на сухо и се промива с 500 µl AW1 буфер (служи за промиване на прикрепената ДНК) чрез центрофугиране на колонките в нови, чисти контейнери на 8000 rpm за 1 минута на микроцентрофуга. След отстраняването на контейнерите с буфера колонките се прехвърлят в нови, чисти контейнери, като ДНК в тях се промива повторно с 500 µl AW2 (буфер за повторно промиване на ДНК върху колонката) чрез центрофугирането им на 14000 rpm за 3 минути. На последния етап от изолирането, ДНК се отделя на колонките чрез елуиране с 200 µl AE (елуиращ буфер).

### **3.2.4. Екстракция с AquaPur Genomic DNA Blood Kit.**

Към 300 µl цяла кръв бяха добавяни 900 µl RBC Lysis Solution. Следва инкубация за 3 минути. След центрофугиране за 20 сек. на 13,000–16,000 g се отделя супернатантата и пробите се вортексират за 10 сек. Добавят се 300 µl Genomic DNA Lysis Solution. След прибавяне на 100 µl Protein Precipitation Solution пробите се центрофугират на 13,000–16,000 g за 3 минути. Супернатантата се прехвърля в чиста микроцентрофужна епруветка съдържаща 100% изопропанол и се центрофугира на 13,000–16,000 g за 1 мин. Супернатантата се премахва и утаената ДНК се промива с 300 µl 70% етанол. След центрофугиране на 13,000–16,000 g за 1 минута етанола се отделя и изолираната ДНК се изсушава за 10-15 минути. Добавя се 50–100 µl DNA Hydration

Solution и се инкубира за 24 часа на стайна температура. Следва вортексиране за 5 сек. ДНК се съхранява на 4 °С.

### 3.2.5. Количествена и качествена оценка на екстрахираните ДНК.

Концентрацията на ДНК беше замервана спектрофотометрично. Измерванията бяха провеждани при дължина на вълната 260nm, което позволяваше и контролиране на чистотата (примеси на белтък, фенол и др) на препаратите. Количествените стойности на ДНК бяха получавани автоматично или пресмятани по формулата:

$$X \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times D$$

където: X е концентрацията на ДНК в  $\mu\text{g/ml}$ ;  $A_{260}$  е екстинцията на ДНК при дължина на вълната 260nm; D – фактор на разреждане.

Ефективността на използваните методи за ДНК екстракция и качеството на получената ДНК допълнително бяха контролирани за специфична амплификация на 110-bp фрагмент на  $\beta$ -глобиновия ген. Положителната амплификация на  $\beta$ -глобиновия ген (Saiki et al., 1985) осигурява информация относно наличието на т. нар. вътрешна инхибиция на системата (напр. от неочистения хем на хемоглобина или други химически субстанции, които могат да инхибират Таq-полимеразата), която би довела до фалшиво-отрицателни резултати при последващите анализи (Wilson I., 1997).

Порции от всички екстрахираните ДНК бяха анализирани електрофоретично в 2% агарозен гел, съдържащ етидиев бромид, за кратко време (10 – 15 минути/120V). Целта на този тест беше да се установи степента на интактност на екстрахираната ДНК (наличие и степен на фрагментиране на високомолекулната ДНК – smear).

### 3.3. Олигонуклеотидни праймери и праймерни системи.

За целите на изследванията бяха използвани различни олигонуклеотидни праймери, представени на **таблица 2**. Те бяха заимствани от публикации в специализирани издания (Simmonds et al., 1998).

Подбраните от нас праймерни секвенции са синтезирани от NZYTech, Portugal.

**Таблица 2.** Олигонуклеотидни праймерни двойки използвани в различните PCR системи за детекция на TTV.

Праймери	PCR - рунд	Полярност	Място в генома (nt)	Нуклеотидна секвенция (5'-3')
<b>Първа праймерна система</b>				
AS1	Първи	Sense	1901-1923	CAGACAGAGGAGAAGGCAACATG
AR1	Първи	Antisense	2228-2208	TACCAATTAGCTCTCTATTCTWA
BS1	Втори	Sense	1915-1938	GGMAAYATGYTRTGGATAGACTGG <sup>1</sup>
BR1	Втори	Antisense	2192-2072	CTACCTCCTGGCATTTTACCA
<b>Втора праймерна система</b>				
LB1S	Първи	Sense	3087-3110	GTGGGACTTTCACTTGTTCGGGTGTC
LB1R	Първи	Antisense	3392-3368	GACAAATGGCAAGAAGATAAAGGC
LB2S	Втори	Sense	3120-3141	AGGTCACTAAGCACTCCGAGCG
LB2R	Втори	Antisense	3362-3342	GCGAAGTCTGGCCCCACTCAC
<b>Трета праймерна система</b>				
Универсални				
NS1	Първи	Sense	99-118	ACWKMCGAATGGCTGAGTTT <sup>1</sup>
NS2	Първи	Sense	99-118	RGTGRCGAATGGYWGAGTTT <sup>1</sup>
NR1	Първи	Antisense	208-227	CCCKWGCCCCGARTTGCCCCCT <sup>1</sup>
NR2	Първи	Antisense	208-227	AUCTWGCCCCGAATTGCCCCCT <sup>1</sup>
TTV- специфичен				
NR II	Втори	Antisense	192-212	CCCCTTGACTBCGGTGTGTAA
NS1/NS2	Втори	Sense		

**Легенда:** <sup>1</sup>W означава А или Т; М означава А или С; R отговаря на А или G; K означава G или T; Y отговаря на C или T; V означава C, G или T.

Използваните праймерни системи бяха контролирани по отношение на специфичността им по два основни начина: (а) чрез въвеждане на избраните секвенции в програмата Blast Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), разработена от Националния Център по Биотехнологични Изследвания, САЩ (NCBI) за оценка на специфичността им спрямо всички публикувани в

геномните банки; (б) определяне специфичността на праймерите, използвани при изследването на TTV, чрез подбрани различни вирусни геноми (различно стоящи в родствено отношение спрямо TTV) и контролни такива. Всички експерименти бяха провеждани в 2 епруветки и 3-кратно повторение при едни и същи условия, за да докажем възпроизводимост на резултатите. При тестването бяха използвани по 0,5 µg от всяка от контролните ДНК, които бяха амплифицирани по протоколите, съответстващи на всяка от праймерните двойки.

### **3.4. Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction, PCR).**

Детекцията на специфични TTV секвенции беше извършвана с помощта на различни PCR системи. Целият лабораторен инструментариум (пипети, епруветки, стативи, връхчета), както и използваните реактиви и химикали бяха предназначени специално за провеждане на молекулярно-биологични изследвания. При всяка реакция бяха включвани необходимите положителни и отрицателни амплификационни и екстракционни контроли. Всички манипулации бяха провеждани при стриктно спазване на изискванията за работа с инфекциозни материали на 2-ро ниво за биобезопасност, BSL- 2 (BioSafety Level-2). Реакциите бяха провеждани на PCR термоциклер (MiniCycler PTC-150™; MJ Research, USA). Използвани бяха подходящите за целта стерилни RNase-free/DNase-free 0,5 ml PCR епруветки както и PCR SuperMix (Invitrogen, USA) който съдържа всички реагенти за амплификацията на нуклеинови киселини чрез PCR. Всички работни разреждания бяха приготвяни от нас непосредствено преди употреба.

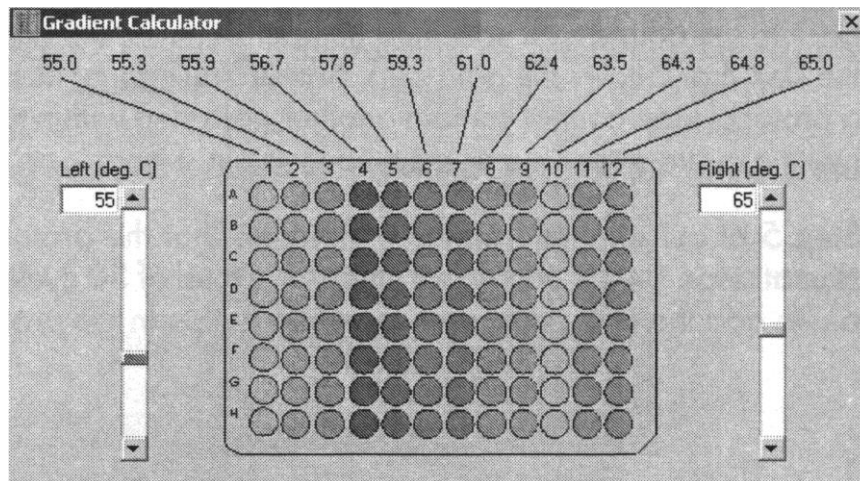
За да подберем подходящите варианти на полимеразната верижна реакция, които да използваме в нашите изследвания за детекция и анализ на TTV, бяха изпробвани и оптимизирани различни праймерни системи и амплификационни програми. Сравнена беше чувствителността и специфичността на различни праймерни двойки.

### 3.4.1. Експериментално определяне на оптималната температура за хибридизация (спояване) на праймерите.

За да оптимизираме използваните от нас PCR системи със съответните праймери, най-напред беше определена тяхната температура на топене (melting temperature,  $T_m$ ). Изчисленията бяха извършени с помощта на формулата на Wallace:

$$T_m = [(A/T) \times 2 + (G/C) \times 4] \text{ (Wallace et al, 1979)}$$

Въз основа на теоретично определените  $T_m$  на праймерните двойки, бяха проведени експерименти за определяне на оптималната температура на хибридизация на праймерите. За целта беше използван термоциклер, снабден с градиентен термоблок и позволява програмирането и едновременното инкубиране на различни проби при различни температури (**фиг. 1**), вместо провеждането на отделни експерименти за всяка температура на спояване. В нашите експерименти, началната температура беше програмирана с  $5^\circ\text{C}$  по-ниска от изчислената по формулата на Wallace и постепенно се увеличаваше през  $2\text{-}5^\circ\text{C}$ . Резултатите от експерименталното установяване на температурите на спояване бяха визуализирани и отчитани с помощта на 2% агарозна гел-електрофореза.



**Фигура 1.** Градиентен калкулатор за определяне на температурите за хибридизация на праймерите.

### **3.4.2. Nested-PCR за откриване на TTV.**

#### **➤ PCR с праймерни двойки AS1/AS2 и BS1/BS2.**

Праймерите от първата праймерна система (таблица 3) са комплементарни на кодиращ регион в ORF1. Реакцията беше провеждана в краен обем 50 µl. Оптимизирания протокол за реакцията беше както следва: първоначална денатурация на 94°C за 5 минути, последвана от 30 амплификационни цикъла - денатурация на 94°C за 1 минута, хибридизация при 52°C за 1 минути, елонгация при 72°C за 1.5 минути, последвана от крайна екстензия при 72°C за 10 минути. Втората nested PCR реакция беше проведена при следните реакционни условия: денатурация на 94°C за 1 минута, хибридизация при 56°C за 1 минута, елонгация при 72°C за 1.5 минути, последвана от крайна екстензия при 72°C за 10 минути. Реакционната смес за първият цикъл на реакцията беше съставена от следните компоненти: Buffer –(10x), Enhancer SolutionP (5x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM) от всеки дезоксирибонуклеотидтрифосфат, праймерите бяха прибавяни в концентрация от по 10 pmol/µl всеки, Taq DNA полимеразата (5U/µl), изолирана тотална DNA (10 µl). Остатъчният обем до 50 µl беше допълван със съответното количество дейонизирана вода. Използваните реагенти са предоставени от PeqLab, Germany. Използваните реактиви при вторият цикъл са същите като вместо ДНК добавяхме 2 µl амплифициран продукт от първия цикъл. Очакваният амплификационен продукт е с размери 278 bp.

Резултатите бяха визуализирани и отчитани след 2% агарозна гел-електрофореза.

#### **➤ PCR с праймерни двойки LB1S/LB1R и LB2S/LB2R.**

За подобряване чувствителността на молекулярната детекция на TTV беше използвана втората праймерна система (таблица 3), която е насочена към консервативни UTR региони на човешките анеловирусни геноми (Paul et al., 2001). Двойката LB2S/LB2R фланкира регион с големина от 243 bp, който се пада вътрешен по отношение на региона ограждан от LB1S/ LB1R и е специфичен за TTVите. При провеждане на реакцията беше приложен следния работен протокол: начална денатурация на 94°C за 5 минути,



последвана от 35 цикъла денатурации на 94°C за 20 сек., хибридизация на 56°C за 30 сек., елонгация при 72°C за 30 сек., крайна екстензия при 72°C за 10 минути. Реакцията беше провеждана в обем 50 µl и се състоеше от следните компоненти: Buffer – (10x), Enhancer SolutionP (5x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM), праймери 10 pmol/µl всеки, Taq DNA полимераза (5U/µl), DNA 10 µl (~ 2 µg), ddH<sub>2</sub>O. Реактивите са предоставени от PeqLab, Germany. Втората nested PCR реакция беше проведена при същите амплификационни условия с втората двойка праймери LB2S/LB2R, но вместо ДНК беше добавян в реакционната смес амплифициран продукт 2 µl от първият цикъл на реакцията. Резултатите бяха визуализирани и отчитани след 2% агарозна гел-електрофореза.

➤ **PCR с праймерни двойки NS1/NR1, NS2/NR2 и NR II.**

Праймерите от третата праймерна система амплифицират фрагмент от 5' UTR областта на анеловирусния геном. В първата nested PCR реакция използвахме микс от праймерите NS1, NS2 (sense) и NR1, NR2 (antisense) (**табл. 2**), които са универсални за детекция на TTV, TTMDV и TTMV (Ninomiya et al., 2008). Във втората PCR реакция използвахме праймерите NS1, NS2 (sense) и специфичният за детекция на TTV NR II (antisense).

Амплификационните продукти от TTV-специфичната PCR (Anello-TTV PCR) реакция са с големина от 112 до 117 bp.

За провеждане на първата реакция с праймерите, NS1/NR1; NS2/NR2 (**табл. 2**), при която се амплифицират части от геномните ДНКи на трите човешки анеловируса (TTV, TTMDV и TTMV) беше приложен следния протокол: начална денатурация 94°C за 5 минути последвана от 35 цикъла състоящи се от следните етапи: денатурация на 94°C за 2 минути 30 сек, хибридизация на 55°C за 30 сек, елонгация на 72°C за 30 сек, последвана от крайна екстензия при 72°C за 7 минути.

Реакцията беше провеждана в обем 50 µl и беше съставена от следните компоненти: Buffer – (10x), Enhancer SolutionP (5x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM), праймери 15 pmol/µl всеки, Taq DNA полимераза (5U/µl), DNA 10 µl (~ 2 µg), ddH<sub>2</sub>O.

Амплифицираната с универсалните праймери ДНК беше подлагана на допълнителна амплификация във втората nested PCR реакция, за доказването

на специфични TTV секвенции, със следният микс от праймери: NS1, NS2 (sense) и NR II (antisense).

Реакцията беше провеждана в обем 50  $\mu$ l. Използваните реактиви при втория цикъл са както следва: Buffer – (10x), Enhancer SolutionP (5x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM), праймери 15 pmol/ $\mu$ l всеки (NS1/NS2-всеки по 1,5  $\mu$ l и NR II-3  $\mu$ l), Taq DNA полимераза (5U/ $\mu$ l), ddH<sub>2</sub>O. Към реакционната смес бяха прибавяни по 2  $\mu$ l ампликон от реакцията с праймерите NS1/NS2 (sense) и NR1/NR2 (antisense).

Условията на реакцията бяха както следва: начална денатурация 94°C за 5 минути последвана от 35 цикъла състоящи се от следните етапи: денатурация на 94°C за 30 сек, хибридизация на 52°C за 30 сек, елонгация на 72°C за 30 сек последвана от крайна екстензия на 72°C за 7 минути. Резултатите бяха визуализирани и отчитани след 2% агарозна гел-електрофореза.

### **3.4.3. Контролиране на PCR системите.**

#### **➤ Отрицателни контроли.**

Като отрицателна контрола беше използвана човешка ДНК, несъдържаща TTV ДНК, екстрахирана от тотална кръв. Контролните ДНК бяха подлагани на същите манипулации, както и пробите за изследване. Паралелно с този начин на контролиране, бяха включвани и тест-проби, които съдържаха всички инградиенти на реакцията, без ДНК(липсващият обем беше заместван от дейонизирана вода).

#### **➤ Вътрешен контрол на PCR системата.**

За вътрешен контрол на качеството на изолираната ДНК беше амплифициран, чрез съответната праймерна довка, 110bp фрагмент на човешкия  $\beta$ -глобинов ген. Реакционната смес съдържаше: Реакцията беше провеждана в обем 50  $\mu$ l и се състоеше от следните компоненти: Buffer – (10x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM), праймери 10 pmol/ $\mu$ l всеки, Taq DNA полимераза (5U/ $\mu$ l), DNA (10  $\mu$ l), ddH<sub>2</sub>O. Амплификационният протокол беше както следва: първоначална денатурация на 94°C за 5 минути, последвана от 30 амплификационни цикъла - денатурация на 94°C за 1 минута,

хибридизация при 55°C за 1 минута , елонгация при 72°C за 1.5 минути, последвана от крайна екстензия при 72°C за 10 минути.

#### **3.4.4. Визуализация и документиране на резултатите.**

Визуализацията на PCR продуктите беше осъществена чрез 2% агарозна гел-електрофореза. Пробите бяха нанасяни в количество 24µl ( 20 µl проба + 4 µl 5X loading buffer). Електрофорезата беше провеждана за 60 минути при постоянна сила на тока и напрежение 100V. Визуализацията на наличните амплификационни продукти (ампликони) и съответните MW маркери (100bp DNA Ladder, Invitrogen) беше отчитана на UV – трансилюминатор.

#### **Буфери за ДНК електрофореза**

**10 xTBEбуфер за 1 l:** 108 g Tris база;55 g Борна киселина; 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 (разреждане 1:10 за достигане на работна концентрация)

**6 x Loading буфер:** 25 mg бромфенол блау ; 25 mg ксилен цианол; 3.3 ml глицерол; 6.7 ml дестилирана вода 12 ( разреждане 1:6 за достигане на работна концентрация)

**1% агарозен гел:** 0.5 g агароза; 50 ml 1 xTBE буфер; 10 µl етидиев бромид [10 mg/ml] (стапят се в микровълнова печка буферът и агарозата, след което се добавя етидиевият бромид, излива се във ваничка и се оставя да полимеризира гелът на стайна температура за 30 минути).

#### **3.5 Секвениране и секвенционен анализ.**

Предварително амплифицирани TTV секвенции от UTR областта на генома бяха секвенирани с помощта на ABI Prism Big Dye Terminator v.1.1 при спазване изискванията на производителя. Реакционната смес в обем 20 µl съдържаше 8 µl готова терминационна смес, 2 pmol от всеки праймер и 50ng PCR продукт, като оставащият реакционен обем беше допълван с дейонизирана вода. Процесът включваше 25 цикъла състоящи се от: денатурация при 96°C за 30 сек, хибридизация при 50°C за 15сек и трета стъпка при 4°C за 4 минути.

Продуктите получени от Big Dye PCR реакцията бяха анализирани чрез ABI 3730 xl съоръжение за капилярна електрофореза. Това ставаше по

следния начин: пробите бяха прехвърляни в специални отделни епруветки и подлагани на цикличен процес, стоящ в основата на дешифрирането на секвенционните последователности получени от Big Dye PCR реакцията. Апаратът е снабден със софтуеър, който отчита и интерпретира флуоресцентната информация и я показва под формата на т. нар. електрофореграма. Информацията беше анализирана с помощта на ABI софтуеър за секвенционен анализ v. 5.2.

Получените геномни секвенции бяха сравнявани с тези, съхранявани в генната банка. Построен беше подравнителен файл (alignment fail), който отразява сравнителната характеристика на нуклеотидните промени при секвенираните и референтните секвенции (NCBI, GenBank). Секвенциите бяха подравнявани чрез Clustal W и коригирани ръчно.

Филогенетичното дърво беше конструирано като използвахме Neighbour joining алгоритъм (NJ) (Saitou N., Nei M., 1987) и двупараметровата корекция въведена от M. Kimura (Kimura two-parameter, 1980).

Вероятността на достоверност (bootstrap probabilities, BPs) на генерираното дърво беше пресмятана за 1000 инициращи репликацията (bootstrap replicates) (Felsenstein J., 1985). При BPs над и около 50% разпределението в клъстери беше смятано за сигнификантно. Дървото показва генетичните взаимовръзки между секвенираните и TTV референтните типове, чрез разпределяне на нашите секвенции в образувани клъстери ( branches ). Всички тези процедури бяха извършени с програмата MEGA 5.

### **3.6.Статистически анализ.**

Направен е анализ на честотите на положителните и отрицателни за TTV проби по изследваните групи клинично здрави индивиди и пациенти с различни заболявания, както и честотата на детекция на вируса с трите праймерни системи. Приложен е тест на Пирсон  $\chi^2$  за доказване на достоверни различия в разпределението на честотите между групите и праймерните системи, при ниво на значимост  $\alpha= 0,05$ .

Стойността на теста се изчислява по формулата:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(f_i - f'_i)^2}{f'_i}$$

където  $f_i$  е емпиричната честота, а  $f'_i$  е теоретичната честота. Тестът на Пирсон сравнява наблюдаваните честоти на положителните проби и теоретичните честоти, такива каквито би трябвало да има, ако делът на положителните проби е еднакъв в изследваните групи и праймерни системи. Достоверни са различията ако стойността на  $p \leq \alpha$ .

Използваните програми за статистически анализ на данните и графично представяне на резултатите са SigmaStat 3.5 и MicrosoftExcel 2010.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Сравняване на различни методи за екстракция на TTV ДНК.

Подбрани бяха по 10 проби от различните групи пациенти, като равни количества от тях бяха обработени с по 4 различни екстракционни техники: протеиназа-К/фенол/хлороформна екстракция и търговските набори DNAzol, QIAamp и AquaPure. Едновременно с количествената оценка на ефективността на екстракционните методи (добив и чистота на ДНК), беше отчитана и годността на ДНК за амплификация (амплификацията на  $\beta$ -глобиновия ген). На **таблица 3** са представени резултатите от сравнителната количествена и качествена оценка на използваните ДНК екстракционни техники.

Получените резултати показват, че различните екстракционни техники имат сравнително еднаква ефективност при ДНК екстракцията от цяла кръв. Най-висок добив ( 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) беше постигнат при екстракцията на ДНК с помощта на QIAamp DNA Blood Mini Kit. Близки стойности бяха постигнати и при използване на реагента DNAzol и търговския набор AquaPure при екстракцията на ДНК. При екстракция с фенол/хлороформ добивът на ДНК, макар и незначително, е по-малък. В същото време от значение е и по-голямата продължителност и трудоемкост на екстракцията.

Порции от всички екстрахиранни ДНК бяха проверени за специфична амплификация на 110-бр фрагмент на  $\beta$ -глобиновия ген. Тази информация беше необходима за да определим дали екстрахираната ДНК е подходяща за същинския PCR анализ (контролиране и вътрешно инхибиране на системата). Получените резултати бяха идентични, независимо от метода/техниката на екстракция на ДНК - амплификацията на  $\beta$ -глобиновия ген беше налице при всички случаи, т.е. пробите съдържаха ДНК годна за амплификация.

**Таблица 3.** Сравнителна количествена и качествена оценка на ДНК екстракции, проведени с различни техники.

Проба от:	Протеиназа К/ Фенол/ Хлороформ			DNAzol			QIAamp			AquaPure		
	1,0*	2**	3***	1,0*	2**	3***	1*	2**	3***	1*	2**	3***
Кръводарители	1,9	1,7	+	2,2	1,7	+	2,4	1,7	+	2,3	1,7	+
Пациенти с хепатит	2,2	1,8	+	2,3	1,8	+	2,3	1,8	+	2,3	1,8	+
Бъбречно трансплантира ни пациенти	1,8	1,8	+	2,4	1,8	+	2,5	1,8	+	2,1	1,8	+
Пациенти с респираторни заболявания	2,1	1,6	+	2,2	1,6	+	2,4	1,6	+	2,2	1,6	+

Легенда: 1\* - добив на ДНК ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); 2\*\* - чистота на екстрахираната ДНК (екстинкция  $A_{260/280}$ ); 3\*\*\* - амплификация на човешки  $\beta$ -глобинов ген.

Имайки предвид получените резултати, при по-нататъшните изследвания използвах QIAamp DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN, Stanford). Проверката на амплификационното качество на екстрахираната ДНК дава полезна информация за годността ѝ за молекулярни проучвания.

#### 4.2. Специфичност на праймерите за детекция на TTV.

За да определим чувствителността и специфичността на праймерите, използвани при изследването за TTV секвенции, бяха проведени амплификационни анализи с подбрани вирусни геноми (различно стоящи в родствено отношение спрямо TTV) и контролни вирусни геноми. Всички експерименти бяха повтаряни трикратно, за да се докаже възпроизводимост на резултатите. При всички реакции бяха използвани по 0,5 $\mu\text{g}$  от екстрахираните контролни ДНК, които бяха амплифицирани по протоколите,

съответстващи на всяка от праймерните двойки. Получените резултати доказват високата специфичност на избраните и използвани от нас праймерни олигонуклеотиди за детекция ТТV. При нито един от случаите не беше наблюдавана кръстосана (неспецифична) PCR амплификация (табл. 4).

**Таблица 4.** Специфичност на праймерните двойки, използвани за детекция на ТТV в кръв.

Праймерна двойка за откриване на ТТV	Контролни вирусни ДНК						
	1	2	3	4	5	6	7
AS1/AR1; BS1/BR1	-	-	-	-	-	+	+
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	-	-	-	-	-	+	+
NS1/NR1; NS2/NR2;NR II	-	-	-	-	-	+	+

В колони с номера от 1 до 7 са отразени резултатите от амплификацията на секвенции от геноми на различни в родствено отношение вирусни ДНК: (1) HSV-1; (2) HSV-2; (3) SV-40 контролен геном; (4) контролен HPV-18 геном; (5) JCV контролен геном (щам Mad-1); (6) лаб. № 272 ДНК, изолирана от донор на кръв. Пробата е предварително установена като положителна за човешки анеловируси; (7) лаб. № 004/213 ДНК, изолирана от кръв на пациент с вирусен хепатит и предварително е доказано присъствието на ТТвируси.

### 4.3. Оптимизиране на PCR за детекция и анализ на НА ТТV.

#### 4.3.1. Експериментално определяне на оптималната температура за хибридизация на праймерите.

За да оптимизираме използваната от нас PCR система с праймери AS1/AR1 и BS1/BR1 най-напред беше определена тяхната температура на топене (*melting temperature*,  $T_m$ ). Изчисленията бяха извършени с помощта на формулата на Wallace:  $T_m = [(A/T) \times 2 + (G/C) \times 4]$  (Wallace et al, 1979). Беше установено, че  $T_m$  за двойката праймери от първата праймерна



система, които са комплементарни на кодиращ регион в ORF, са съответно 60°C и 56°C за AS1/AS2 и 50°C и 62°C за двойката BS1/BR1.

Въз основа на теоретично определените  $T_m$  на двете праймерни двойки, бяха проведени експерименти за определяне на оптималната температура на хибридизация на праймерите. За целта беше използван термоциклер „Opticon-2” (MJ Research, USA), който е снабден с градиентен термоблок и позволява програмирането и едновременното инкубиране на различни проби при различни температури, вместо провеждането на отделни експерименти за всяка температура на спояване. В нашите експерименти, началната температура беше програмирана с 5°C по-ниска от изчислената по формулата на Wallace и постепенно се увеличаваше до 65°C.

Резултатите от експерименталното установяване на температурите на спояване бяха визуализирани и отчитани с помощта на 2% агарозна гел-електрофореза. Резултатът от експериментите показва, че положителна амплификация има в целия диапазон използвани температури, но най-добра е при температура 52°C за праймерна система AS1/AS2 и 56°C за праймерна система BS1/BR1.

Определяне на оптималната температура за хибридизация (спояване) на избраните от нас праймери за детекция на човешките анеловируси, беше направено и за праймерните двойки от втората и третата праймерни системи. Температурата на топене ( $T_m$ ) на всеки от праймерите и експерименталното определяне на съответните им температури на хибридизация бяха определени по методиката, прилагана по отношение на праймерните двойки от първата праймерна система. Получените резултати са обобщени и представени в **таблица 5**.

**Таблица 5.** Оптимизирани температури за хибридизация на праймерните олигонуклеотиди, използвани при nested PCR реакциите.

Праймер	T <sub>T</sub>	Температурен интервал	T <sub>ann</sub>
AS1 AR1	60°C 56°C	50°C – 60°C	52°C
BS1 BR1	50°C 62°C	45°C - 60°C	56°C
LB1S LB1R	74°C 68°C	50°C- 65°C	56°C
LB2S LB2R	70°C 70°C	50°C - 65°C	56°C
NS1 NR1	56°C 56°C	50°C – 60°C	55°C
NS2 NR2	56°C 62°C	50°C - 60°C	55°C
NRII	64°C	-	
NS1/NRII		50°C – 60°C	52°C
NS2/NRII		50°C - 60°C	52°C

Легенда: T<sub>T</sub> – точка на топене за всеки праймер поотделно; T<sub>ann</sub> – оптимална точка на спояване във всяка двойка праймери в реакция.

#### **4.4. Детекция на TTV в проби от клинично здрави дарители на кръв.**

Установено е, че праймерите, комплементарни на кодиращ регион в ORF1 областта откриват ограничен брой генотипи (Okamoto et al., 2003; Maggi et al., 2003), което на практика ограничава възможността да бъдат

диференцирани специфични генотипи, използвайки един или два сета праймери. При използването на PCR методите за детекция на човешките анеловируси трябва да се има предвид и фактът, че в почти всички случаи става въпрос за смесени инфекции с различни анеловируси и множество генотипи (Okamoto et al., 2003; Maggi et al., 2003). Поради тази причина е важно търсенето и оптимизирането на молекулярни методи за детекция, които не само да регистрират пълният спектър от присъстващи в организма ТТ вируси, но и да охарактеризират качествено и количествено специфичните вирусни групи (генотипи в организма).

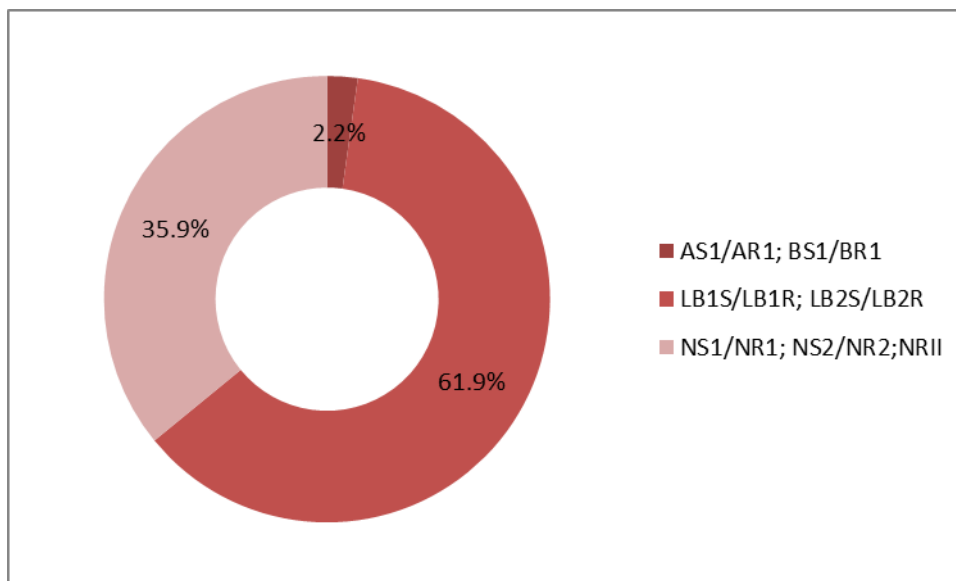
Предимството при използването на nested – PCR системи е това, че прави възможно откриването на малки количества ТТ вирусна ДНК, в кръвни проби.

При изследването на 270 проби от клинично здрави дарители на кръв получихме следните резултати:

- а) Общо с трите праймерни системи броя на положителните проби е 181 от общо 270 проби или 67,03% (табл. 6 и фиг. 2).

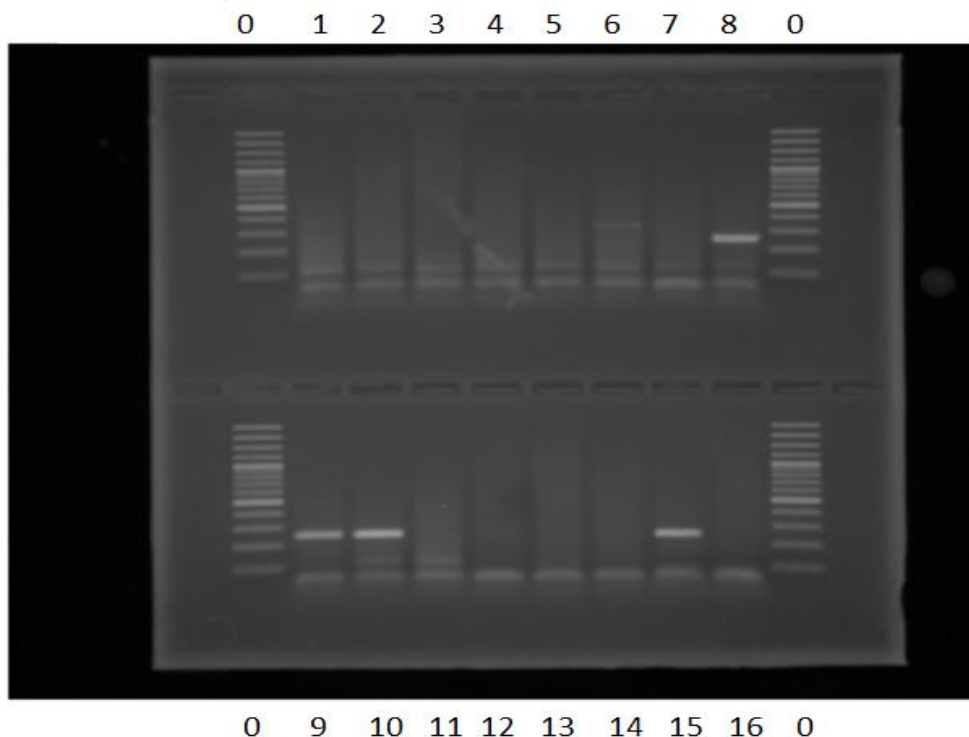
**Таблица 6.** Резултати получени при изследване на кръв от клинично здрави дарители.

<b>Праймерни системи</b>	<b>Брой положителни проби от 181</b>	<b>% положителни проби от 181</b>
AS1/AR1; BS1/BR1	4/181	2.2%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	112/181	61.87%
NS1/NR1; NS2/NR2;NRII	65/181	35. 91%



**Фигура 2.** Детекция на TTV в проби от клинично здрави дарители на кръв

- б) При използването на праймерните двойки от първата праймерна система, която открива фрагмент от кодиращ регион в ORF1 областта, се оказва, че само 4 от тези 181 проби са положителни или 2,2%, което е в съответствие с литературните данни (Nishizawa et al., 1997). Ниският брой положителни проби се дължи на факта, че праймерите, комплементарни на кодиращ регион в ORF1 областта, откриват ограничен брой генотипи поради вариабилността на този регион при различните групи вируси, което на практика ограничава възможността да бъдат диференцирани специфични генотипи. След двете nested PCR реакции полученият ампликон е с размери 278 bp, което съответства на данните от литературата.
- в) За подобряване чувствителността на молекулярната детекция на TTV беше използвана втората праймерна система (**таблица 2**), която е насочена към консервативен участък в UTR региона на TT вирусния геном (Hino et al., 2006). При използването на праймерните двойки LB1S/LB1R; LB2S/LB2R полученият ампликон е с размери 243 bp и е в концентрация достатъчна за да бъде отчетен. Тази PCR система открива по-голям брой генотипи на TTV. Резултатите са представени на **фигура 3**. Броят на положителните проби при използването на тези праймерни двойки е 112 или 61,87%, което прави тази система подходяща за скринингови проучвания.



**Фигура 3.** Агарозна гел-електрофореза на продуктите от nested PCR реакцията с праймерни двойки LB1S/LB1R; LB2S/LB2R (големината на ампликона е 243 bp). Легенда: **0** – молекулен MW маркер 100 bp ( Invitrogen, USA); **15** – положителна контрола. Доказано присъствие на ТТ вирусен ДНК материал чрез първата праймерна система и последващо секвениране; **16** – отрицателна контрола; **8,9,10** - специфични ампликони с размер 243 bp доказват присъствието на специфични анеловирусни секвенции в съответните проби.

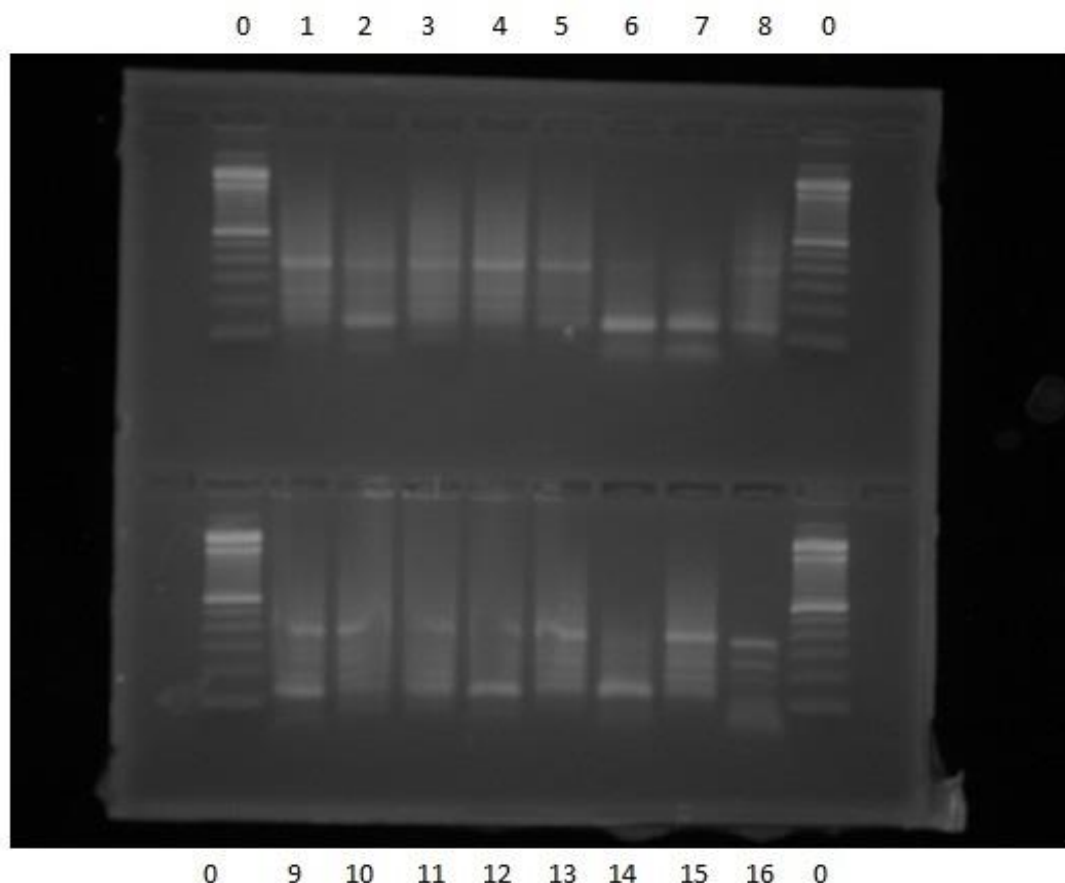
Условията на реакциите бяха следните: начална денатурация на 94°C за 5 минути, последвана от 35 цикъла денатурации на 94°C за 20 сек, хибридизация на 56°C за 30 сек., елонгация при 72°C за 30 сек, крайна екстензия при 72°C за 10 минути. Реакцията беше провеждана в обем 50 µl и се състоеше от следните компоненти: Buffer – (10x), Enhancer SolutionP (5x), MgCl<sub>2</sub> (25mM), dNTP<sub>s</sub> (10mM), праймери 10 pmol/µl всеки, Taq DNA полимераза (5U/µl), DNA 10 µl (~ 2 µg), ddH<sub>2</sub>O. Реактивите са предоставени от PeqLab, Germany. Втората nested PCR реакция беше проведена при същите амплификационни условия с втората двойка праймери LB2S/LB2R, но вместо ДНК беше добавян в реакционната смес амплифициран продукт 2 µl от първият цикъл на реакцията.

г) Поради значителните генетични различия между отделните изолати на TTV, TTMV и TTMDV са разработени PCR методи за генетична характеристика и генотипна идентификация на трите човешки анеловируса (Anello-TTV PCR, Anello-TTMDV PCR и Anello-TTMV PCR). Въпреки, че в голяма част от случаите става въпрос за мултиплена инфекция с различни генотипи на един или два вируса, по литературни данни процентът на разпространение в човешката популация на TTV е по висок. Поради тази причина се спряхме на PCR системата за специфична детекция на TTV (Anello-TTV PCR).

Праймерите от третата праймерна система амплифицират фрагмент от 5' UTR областта, високо консервативен регион на генома след ТАТА бокса, на TT вирусния геном. В първата nested PCR реакция използвахме микс от праймерите NS1, NS2 (sense) и NR1, NR2 (antisense) (**таблица 2**), които са универсални за детекция на TTV, TTMDV и TTMV. Във втората PCR реакция използвахме праймерите NS1, NS2 (sense) и специфичният за детекция на TTV праймер NR II (antisense).

Амплификационните продукти от TTV-специфичната PCR (Anello-TTV PCR) реакция са с големина от 112 до 117 bp.

Получените от нас резултати са представени на **фигура 4**. От 181 положителни проби 65 са позитивни за TTV.



**Фигура 4.** Агарозна гел-електрофореза на продуктите от PCR реакцията с праймерни двойки NS1, NS2 (sense) и NR1, NR2 (antisense) в първата PCR реакция и NS1, NS2 (sense) и NR II (antisense) във втория цикъл на PCR (големината на ампликона е 112 - 117 bp). Условиата на реакцията бяха следните: 1реакция - начална денатурация при 94°C за 5минути последвана от 35 цикъла састоящи се от следните етапи: денатурация на 94°C за 2 минути 30 s, хибридизация на 55°C за 30 s, елонгация на 72°C за 30 s последвана от крайна екстензия при 72°C за 7 минути и 2реакция - начална денатурация 94°C за 5минути последвана от 35 цикъла састоящи се от следните етапи: денатурация на 94°C за 30 s, хибридизация на 52°C за 30 s, елонгация на 72°C за 30 s последвана от крайна екстензия на 72°C за 7 минути. Легенда: **0** – Молекулен MW маркер 100 bp (Invitrogen, USA); **2, 6,7, 8, 9** и **12** - специфични ампликони с размер 112 - 117 bp доказват присъствието на специфични TTV секвенции в съответните проби; **13, 14** и **15** - положителни контроли.Положителните контроли са доказани, чрез първите две праймерни системи. Чрез секвенционен анализ се доказва присъствието на специфични TTVи секвенции. В проби 13 и 15 при

използването на третата праймерна система не беше отчетен ампликон със съответните размери.16 – отрицателна контрола.

Специфичният ампликон регистриран на старт 14 показва присъствието на специфични TTV секвенции в тази положителна проба. Отсъствието на ампликон с такива размери в другите две позитивни контроли може да бъде обяснено с високата степен на рекомбинация между отделните изолати и в тази връзка със специфичността на приложената праймерна система.

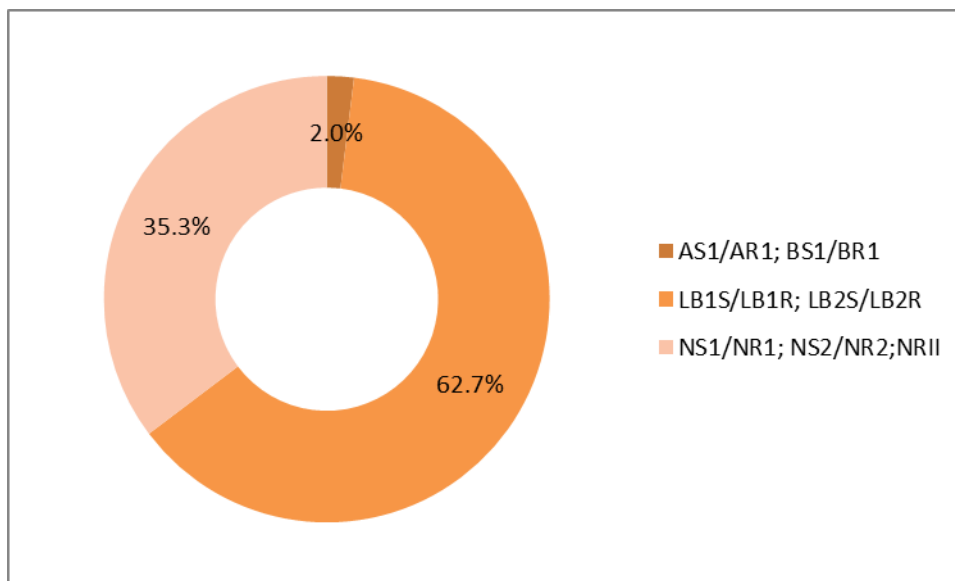
#### **4.5. Откриване на TTV в проби от пациенти с респираторни заболявания.**

При изследването на 90 кръвни проби от пациенти с респираторни заболявания получихме резултатите, представени в **таблица 7** и **фигура 5**. При провеждането на експериментите приложихме методиките, използвани при изследването на дарителска кръв. Условието на PCR реакциите са описани в раздел „Материали и методи”. Общо с трите праймерни системи 51 (56.6%) проби от изследваните 90 показва наличие на ТТ вирусни секвенции.

**Таблица 7** Резултати получени при изследването на 90 кръвни проби от пациенти с респираторни заболявания.

<b>Праймерни системи</b>	<b>Брой положителни проби от 51</b>	<b>% положителни проби от 51</b>
AS1/AR1; BS1/BR1	1/51	1.96%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	32/51	62.74%
NS1/NR1; NS2/NR2;NRII	18/51	35.29%





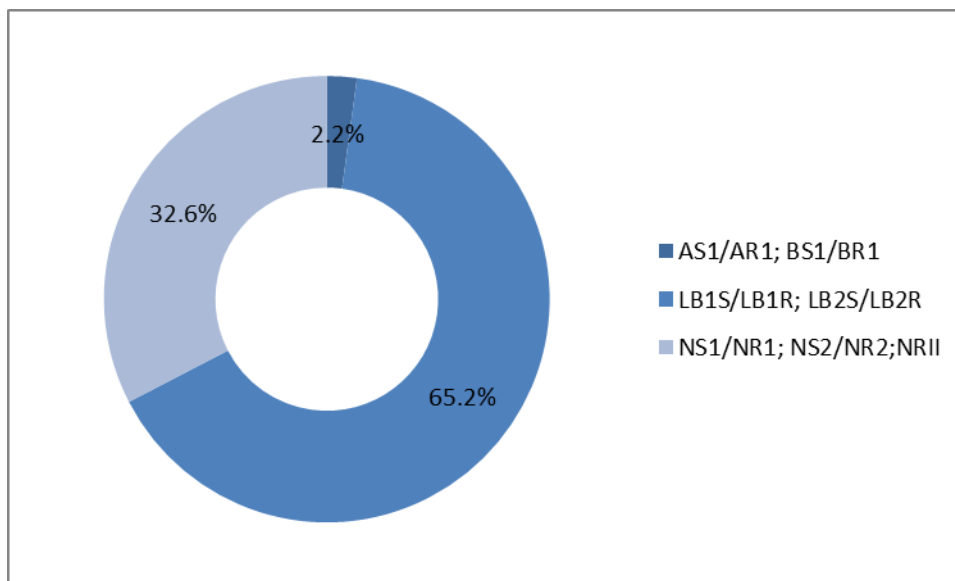
**Фигура 5.** Детекция на TTV в проби от пациенти с респираторни заболявания

#### **4.6. Откриване на TTV в проби от пациенти с вирусен хепатит (HBV).**

Предоставените ни 67 кръвни проби изследвахме за наличие на TTVируси като използвахме методиките, приложени при изследване на дарителската кръв. След агарозна гел - електрофореза на продуктите от nested-PCR с трите праймерни системи бяха установени TT вирусни секвенции при 46 пациента (68, 65%). Резултатите са представени на **таблица 8** и **фигура 6**.

**Таблица 8.** Резултати получени при изследването на кръвни проби от пациенти с вирусен хепатит В.

<b>Праймерни системи</b>	<b>Брой положителни проби от 46</b>	<b>% положителни проби от 46</b>
AS1/AR1; BS1/BR1	1/46	2.17%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	30/46	65.21%
NS1/NR1; NS2/NR2; NR11	15/46	32.60%



**Фигура 6.** Детекция на TTV в проби от пациенти с вирусен хепатит (HBV)

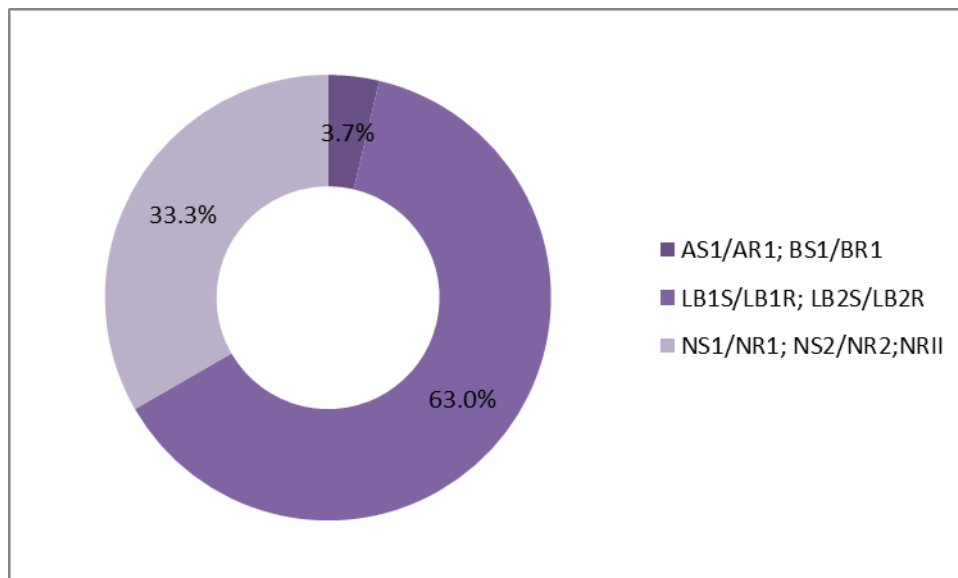
#### **4.7.Откриване на TTV в проби от пациенти със заболявания с неизяснена патология**

В тази група се включват пациенти с неизяснено фебрилно състояние, синдром на хроничната умора, промени в кръвните показатели без клинична изява и др.

Резултатите, които получихме при изследването на 65 кръвни проби от пациенти с неизяснена патология са представени в **таблица 9** и **фигура 7**. При провеждане на експериментите с трите праймерни системи установихме общо присъствието на анеловирусни геноми в 27(42%) от тях.

**Таблица 9.** Резултати получени при изследването на кръвни проби от пациенти с неясна патология.

<b>Праймерни системи</b>	<b>Брой положителни проби от 27</b>	<b>% положителни проби от 27</b>
AS1/AR1; BS1/BR1	1/27	3.7%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	17/27	62.96%
NS1/NR1; NS2/NR2; NR II	9/27	33.33%



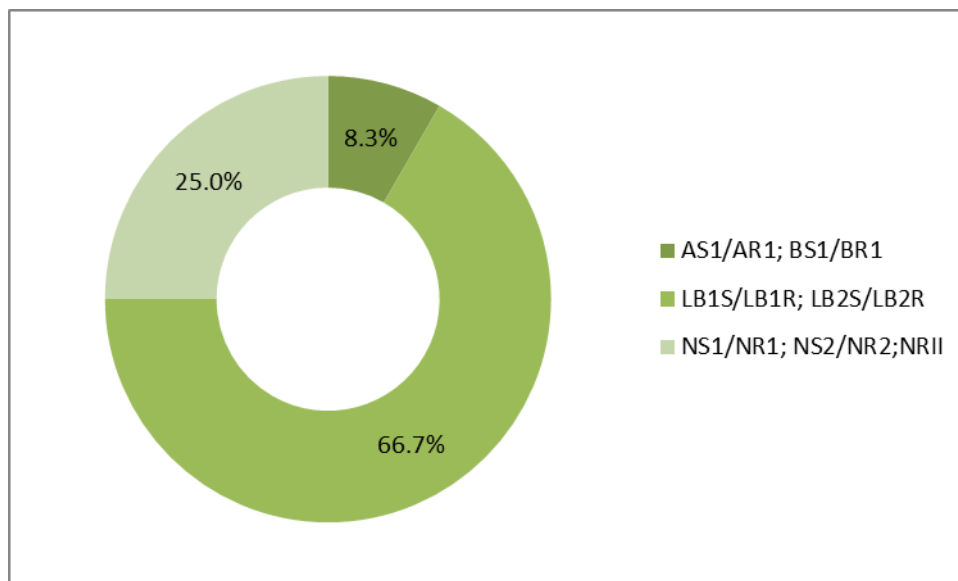
**Фигура 7.** Детекция на TTV в проби от пациенти с неизяснена патология

#### **4.8. Откриване на TTV в проби от пациенти с първични мозъчни тумори.**

Според различни източници, човешки TTV-вируси се откриват в кръвта на около 70% от пациенти, страдащи от различни тумори (рак на гърдата, рак на дебелото черво, хепатоцилуларен карцином, назофарингеален карцином и др.). Досега не сме попадали на данни, свързани с откриване на TTV при мозъчни тумори. Нашите резултати, проведени с трите праймерни системи, показват, че от общо 23 изследвани кръвни проби 12 (52.17%) са положителни. Резултатите са онагледени в **таблица 10** и **фигура 8**.

**Таблица 10.** Резултати получени при изследването на 23 кръвни проби от пациенти с мозъчни тумори.

Праймерни системи	Брой положителни проби от 12	% положителни проби от 12
AS1/AR1; BS1/BR1	1/12	8.33%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	8/12	66.66%
NS1/NR1; NS2/NR2; NR2	3/12	25%



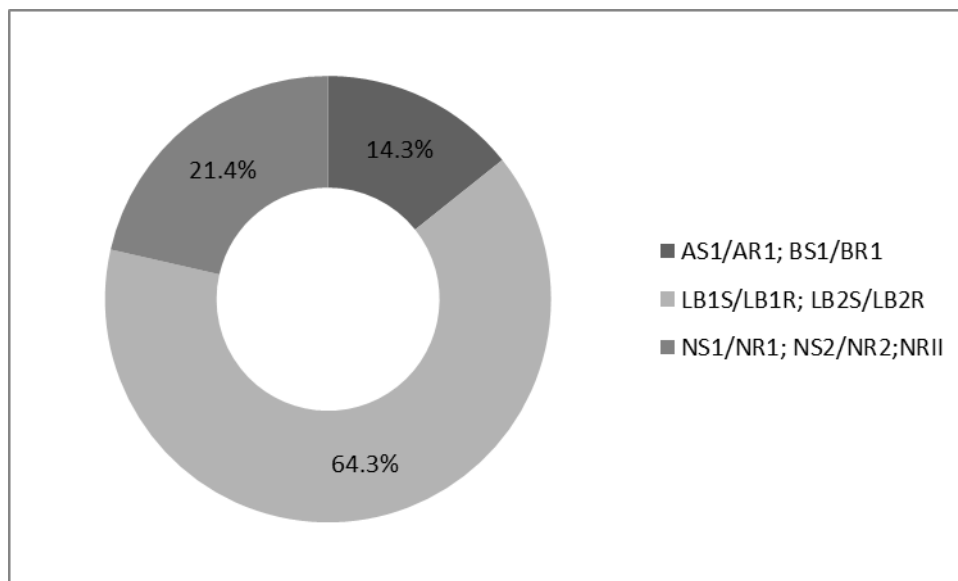
**Фигура 8.** Детекция на TTV в проби от пациенти с първични мозъчни тумори

#### **4.9. Детекция на TTV в кръвни проби от пациенти с бъбречна трансплантация.**

Нашите резултати проведени, с трите праймерни системи, показват, че от общо 20 изследвани кръвни проби 14 (70%) са положителни. Резултатите са онагледени в **таблица 11** и **фигура 9**.

**Таблица 11.** Резултати получени при изследването на 20 кръвни проби от бъбречно трансплантирани пациенти.

<b>Праймерни системи</b>	<b>Брой положителни проби от 14</b>	<b>% положителни проби от 14</b>
AS1/AR1; BS1/BR1	2/14	14.28%;
LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	9/14	64.28%
NS1/NR1; NS2/NR2; NR11	3/14	21.42%



**Фигура 9.** Детекция на TTV в кръвни проби от пациенти с бъбречна трансплантация

#### **4.10. Проучване на генетичното разнообразие на TT вирусите в България.**

##### **5.10.1 Определяне на основните генотипове на TT вирусите, циркулиращи в България.**

Първоначално бяха избрани 10 ДНК фрагмента за секвениране. Пробите за секвениране бяха избрани с оглед включването на секвенции от всички представителни групи. Най добри резултати се получиха при секвенционния анализ на 7 TTV ДНК фрагмента. В останалите три случая предвид наличието най-вероятно на няколко TTV генотипа в една проба данните не бяха достатъчно достоверни за обработка. Поради тази причина за да определим генотиповете на TT вирусите, циркулиращи най-често сред изследваните групи пациенти, ние проведохме секвенционен анализ на 7 представителни TTV ДНК фрагмента. Изходната вирусна ДНК беше изолирана от кръвни проби на клинично здрави дарители на кръв, пациент с положителна проба за HB<sub>s</sub>Ag и пациент с неизяснено фебрилно състояние (табл. 12).

**Таблица 12.** Характеристика на пациентите и номер на пробите, от които са получени ампликоните и тяхното обозначаване при секвенционното проучване.

<b>№ на секвенираната проба/Пациент №</b>	<b>Характеристика на пациента</b>	<b>Обозначение на секвенирания фрагмент</b>
1. №751	Положителна проба за HB <sub>s</sub> Ag	BG1G751
2. №004/213	Неясно фебрилно състояние	BG2L2013/004
3. №4P	Клинично здрав дарител на кръв	BG3B4P
4. №8P	Клинично здрав дарител на кръв	BG4B8P
5. №15P	Клинично здрав дарител на кръв	BG5B15P
6. №21P	Клинично здрав дарител на кръв	BG6B21P
7. №23P	Клинично здрав дарител на кръв	BG7B23P

При секвенционния анализ бяха използвани референтни ТТ вирусни геноми, налични в генната банка (Genbank, NCBI, USA). Характеристиките на референтните секвенции със съответните наименования на изолатите са представени в **таблица 13**.

**Таблица 13.** Референтни секвенции използвани при секвенционното проучване.

<b>Наименование на съответния изолат</b>	<b>Източник за изолиране на ДНК</b>	<b>Код за достъп в генната банка</b>
TA278	кръв	AB017610
TUS01	кръв	AB017613
SANBAN	кръв	AB025946
GH1	кръв	AF122913
JA20	кръв	AF122914
JA9	кръв	AF122915
JA1	кръв	AF122916
JA4	кръв	AF122917
JA2B	кръв	AF122918
JA10	кръв	AF122919
US35	кръв	AF122920
US32	кръв	AF122921
BDH1	кръв	AF116842
TTVCHN1	кръв	AF079173
TTVCHN2	кръв	AF129887

Всички секвенции бяха конвертирани и нуклеотидно подравнени с референтните щамове. От получените подравнителни файлове бе конструирано филогенетично дърво по метода Neighbour-Joining (**фиг. 10**).





При анализа на дървото се вижда, че по-голяма част от нашите секвенции: BG4B8P, BG7B23P, BG5B15P и BG3B4P са генетично свързани, с голяма степен на корелация, и попадат в един клъстер. Анализът показва, че става дума за близко родство и най – вероятно за общ предшественик. Би могло да става въпрос за отделен клъстер или за началото на нов клон в рамките на споменатия клъстер заедно с референтните секвенции, клъстериращи по литературни данни (Worobey 2000) в генотип 1. Пробите от здрави донори на кръв, обозначени съответно като BG4B8P, BG7B23P, BG5B15P и BG3B4P съдържат подобни една на друга секвенции и се отделят в самостоятелен клон. Отделянето им в самостоятелен клон може да е в резултат на честотата на рекомбиниране, характерна за TTVите или да е началото на нова геногрупа. От получените резултати можем да допуснем, че нашите TTV секвенции от здрави донори на кръв може би дават началото на нов клон в рамките на споменатия клъстер или на самостоятелен нов клъстер. Изолат BG2L2013/004 попада в един клъстер с изолат JA4 и JA10 TTVCHN2, които са представители на генотип 2. Подходът, който използва програмата, до която имахме достъп, не разделя много ясно генотип 2 и генотип 3 на TTV, което се дължи на полиморфизъм, определен от рекомбинацията, характерна за човешките анеловируси (Worobey 2000). Анализът на филогенетичното дърво по отношение на другите две секвенции BG6B21P и BG1G751 показва голяма разлика както по отношение на нашите, така и по отношение на референтните секвенции. Те не се доближават до генотип 1,2 или 3.

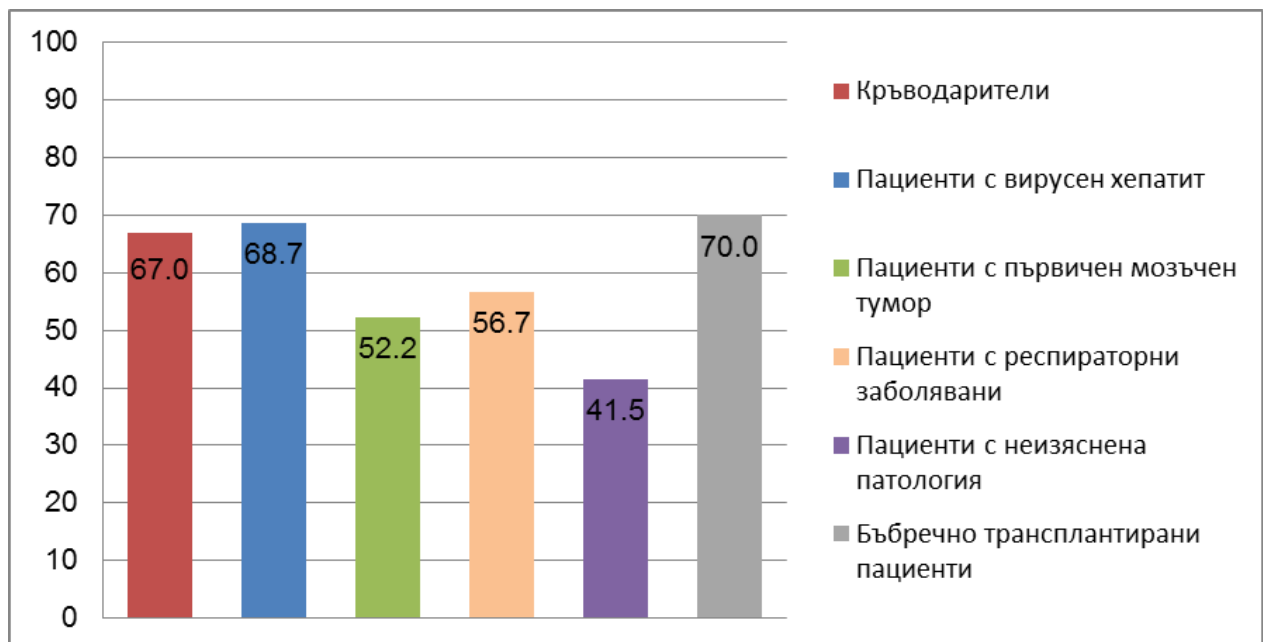
#### **4.11. Статистическа обработка на резултатите.**

Доказаха се достоверни различия между изследваните групи индивиди по дела на положителните за TTV проби ( $\chi^2 = 18.3$ ,  $p = 0.003$ ).

Тестът на Пирсон показва статистически достоверни различия между дела на регистрираните случаи на TT вируса с различните праймерни системи ( $\chi^2 = 266.6$ ,  $p < 0.001$ ). Праймерната система LB1S/LB1R; LB2S/LB2R се оказва най-ефективна (табл. 14 и фиг. 11).

**Таблица 14.** Брой открити положителни проби с различните праймерни системи.

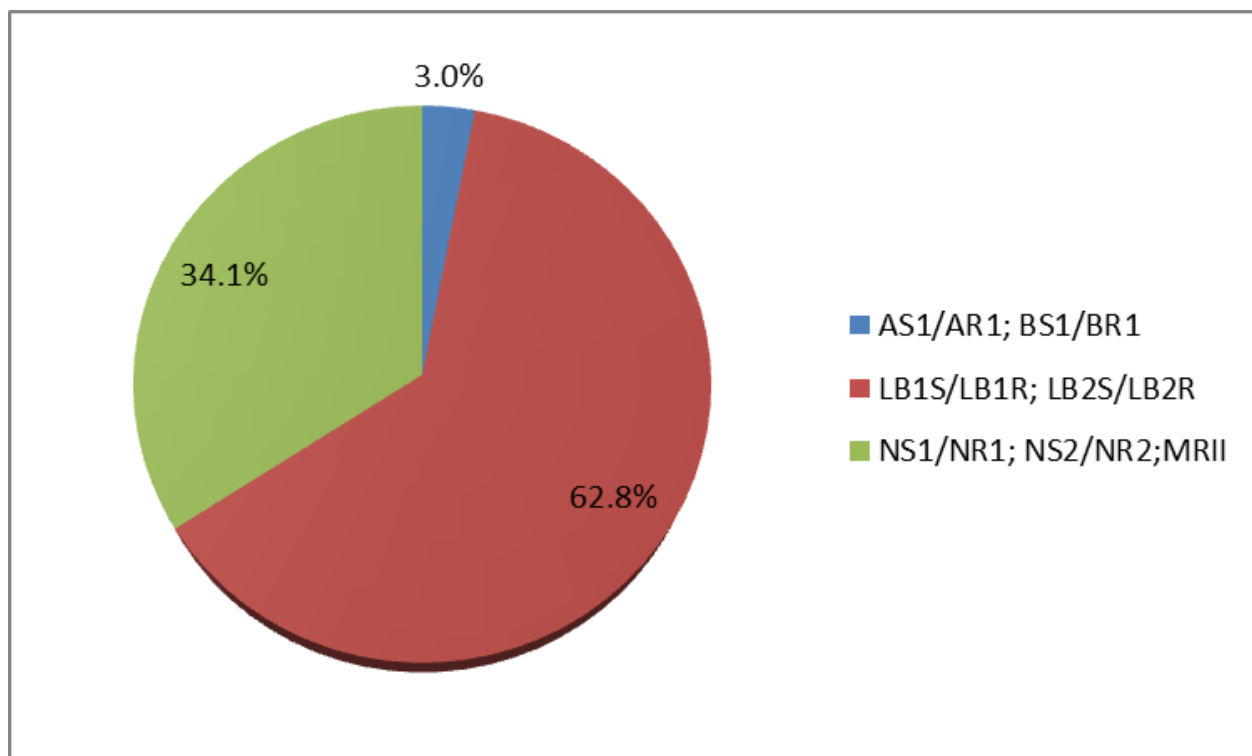
групи/праймерни системи	AS1/AR1; BS1/BR1	LB1S/LB1R; LB2S/LB2R	NS1/NR1; NS2/NR2;MRII
Кръводарители	4	112	65
Пациенти с вирусен хепатит	1	30	15
Пациенти с първичен мозъчен тумор	1	8	3
Пациенти с респираторни заболявания	1	32	18
Пациенти с неизяснена патология	1	17	9
Бъбречно трансплантирани пациенти	2	9	3
<b>общо (брой)</b>	<b>10</b>	<b>208</b>	<b>113</b>
<b>общо (процент)</b>	<b>3.0</b>	<b>62.8</b>	<b>34.1</b>



**Фигура 11.** Разпределене на положителните проби регистрирани при използване общо на трите праймерни системи (в %) по групи.

Статистическата обработка на резултатите доказва като най ефективна за мащабни скринингови проучвания втората праймерна система LB1S/LB1R и LB2S/LB2R.

Детекцията на ТТV (в %) при използването на трите праймерни системи по отделно е представена на **фигура 12**.



**Фигура 12.** Резултати получени при използването на трите праймерни системи по отделно.

## 5. Обсъждане.

Трите вируса - TTV, TTMV и TTMDV инфектират голяма част от човешката популация. Инфекциите, които предизвикват, се характеризират с доживотна виремия. От друга страна при тях е налице значителна генетична вариабилност на причинителите. Предполага се, че TTV-ните инфекции са свързани с много и най-различни заболявания: белодробни, чернодробни, хематологични нарушения и рак. Все още няма категорични доказателства за пряката връзка между TTV – ните инфекции и специфичните клинични прояви на тези заболявания.

Масштабните епидемиологични проучвания на ТТ вирусните инфекции са затруднени поради липсата на достатъчно надеждни серологични методи. Това налага търсенето на молекулярно-диагностични системи, с помощта на които е възможна не само детекцията на пълния спектър от циркулиращи ТТ вирусни генотипи и групи, но и тяхната характеристика и количествено определяне.

Предмет на нашата научна разработка беше адаптиране на ефективни PCR системи за детекция на ТТ вирусите и тяхното разпространение в България.

Изследвани бяха общо 535 кръвни проби от здрави кръводарители, пациенти с регистриран вирусен хепатит, пациенти с първичен мозъчен тумор, пациенти с респираторни заболявания, пациенти с неизяснена патология, бъбречно трансплантирани пациенти.

В процеса на работа, направихме сравнителна количествена и качествена оценка на ДНК екстракцията по 4 различни техники. Получените резултати ни дадоха възможност да определим най-ефективната обработка на цяла кръв. Последващото експериментално определяне на оптималните температури за хибридизация на праймерите ни позволи да адаптираме ефективни протоколи за провеждане на PCR. Определихме оптимален амплификационен режим за всяка от изследваните праймерни двойки.

При използването на праймерните двойки от първата праймерна система, която открива фрагмент от кодиращ регион в ORF1 областта, получихме резултати, които потвърждават данните на други автори относно разпространението на ТТ вирусите сред човешката популация в други

държави. Броят на положителните проби регистрирани при прилагането на тази система е по - нисък в сравнение с другите две праймерни системи: от 1.96% при пациенти с респираторни заболявания до 14.28% при бъбречно трансплантирани пациенти. Това се дължи на факта, че праймерите комплементарни на кодиращ регион в ORF1 областта откриват ограничен брой генотипове поради вариабилността на този регион при различните групи вируси. Прави впечатление сравнително по-големият процент положителни проби, регистрирани при използването на първата праймерна система, при бъбречно трансплантирани пациенти 14.28% и пациенти с мозъчни тумори 8.33% за разлика от броя на положителните проби установени при останалите изследвани групи – между 1% и 3%.

За подобряване чувствителността на молекулярната детекция на ТТВ беше използвана втората праймерна система (**таблица 3**), която е насочена към консервативен участък в UTR региона на човешките анеловирусни геноми. При използването на праймерните двойки LB1S/LB1R; LB2S/LB2R броят на положителните проби при всички изследвани групи е значително по – голям. Това се дължи на факта, че тази праймерна система открива по-голям брой генотипи на ТТВ вирусите. Получените от нас резултати показват почти 30 пъти по-голям процент положителни проби при клинично здрави дарители на кръв, пациенти с респираторни заболявания и пациенти с вирусни хепатити, в сравнение с броя на положителните проби регистрирани при прилагането на първата праймерна система спрямо пробите от същите групи.

Изследването на проби от пациенти с неясна патология чрез втората праймерна система показва, че процентът на положителните проби е 62.96% в сравнение с този при използването на първата праймерна система – 3.7%. Броят на положителните за ТТВ вирусни проби, които регистрирахме при използване на праймерните двойки от втората праймерна система, при пациенти с мозъчни тумори надвишава с осем пъти броя на отчетените положителни проби получени при реакцията проведена с праймерите от първата праймерна система. Нивото на ТТВ вирусните инфекции значително се повишава чрез използването на LB1S/LB1R; LB2S/LB2R праймерни двойки и при изследване на кръвни проби от бъбречно трансплантирани пациенти - 64.28% спрямо нивото регистрирано с първата праймерна система - 14.28%.

Поради значителните генетични различия между отделните изолати на ТТVите са разработени PCR методи за генетична характеристика и генотипна идентификация на трите човешки анеловируса (Anello-TTV PCR, Anello-TTMDV PCR и Anello-TTMV PCR). Спряхме се на PCR системата за специфична детекция на ТТV ( Anello-TTV PCR ) тъй като по литературни данни процента на разпространение в човешката популация на ТТV е по висок, въпреки че винаги става въпрос за смесена инфекция с два или три човешки анеловируса.

Получените от нас резултати показват наличие на специфични ТТV секвенции от 21.42% при бъбречно трансплантирани пациенти до 35.91% при кръвни проби от здрави кръводарители. Повече от половината от положителните проби при всички изследвани групи, установени с праймерните двойки от втората праймерна система, показват наличие на тези специфични секвенции.

Изследванията по отношение на генетичното разнообразие на ТТвирусната популация показват, че нашите ТТV секвенции от здрави донори на кръв може би дават началото на нов клон в рамките на споменатия клъстер или на самостоятелен нов клъстер. За по – точното определение на връзките между нашите и референтни секвенции са необходими мащабни секвенционни проучвания и анализиране на по – голям брой патогенни изолати каквито все още липсват в генната банка.

Предполага се, че непрекъснато променящото се ниво на трите човешки анеловируса един спрямо друг, респективно вирусният товар, или комбинацията от генотипи на всеки от тези вируси е асоциирано с патогенността или с потенциала на тези вируси да предизвикват заболявания. Поради тази причина усилията са насочени към развитието на ефективни методи за диференцирано количествено определяне на геномните ДНК на трите анеловируса.

## 6. ИЗВОДИ.

1. Получени са резултати от проведено за първи път в България проучване на разпространението на човешките анеловируси сред различни групи от българската популацията. Установено е широко разпространение на тези вируси.
2. Получените от нас резултати показват наличие на специфични ТТ вирусни секвенции в кръвни проби от здрави кръводарители. Най-голям процент (61.87%) положителни проби е регистриран при използването на праймерна система LB1S/LB1R; LB2S/LB2R.
3. Резултатите получени при изследването на 90 кръвни проби от пациенти с респираторни заболявания показаха, че общо с трите праймерни системи 51 проби от изследваните 90 са положителни по отношение присъствието на ТТ вирусни секвенции. Броя на положителните проби е най-голям при детекция с праймерна система LB1S/LB1R; LB2S/LB2R, а именно 62.74%.
4. След агарозна гел-електрофореза на продуктите от nested-PCR с трите праймерни системи бяха установени ТТ вирусни секвенции при 46 пациенти с регистриран HBV от общо изследвани 67. Отново най-голям процент положителни проби (65,21%) е регистриран при използването на втората праймерна система.
5. Резултатите, които получихме при изследването на 65 кръвни проби от пациенти с неизяснена патология, с трите праймерни системи, показват присъствието на анеловирусни геноми в 27 от тях като 62.96% са открити чрез прилагането на втората праймерна система LB1S/LB1R; LB2S/LB2R.
6. При изследване на 23 кръвни проби от пациенти с първични мозъчни тумори се доказва присъствието на специфични ампликони в 12 от тях.

Процентът на положителните проби при детекцията с втората праймерна система е 66,66%.

7. Резултатите получени при изследването на 20 кръвни проби от бъбречно трансплантирани пациенти показват, че 64,28% от тях са положителни за ТТ вирусни специфични секвенции след използването на системата от праймери LB1S/LB1R; LB2S/LB2R.
8. Адаптираната nested PCR система с LB1S/LB1R; LB2S/LB2R праймерни двойки е подходяща и ефективна за мащабни скринингови проучвания сред различни групи от българското население
9. По-голяма част от нашите секвенции: BG4B8P, BG7B23P, BG5B15P и BG3B4P са генетично свързани. С голяма степен на корелация те попадат в един клъстер. Анализът показва, че става дума за близко родство и най – вероятно за общ предшественик. От получените резултати можем да допуснем, че нашите TTV секвенции от здрави донори на кръв може би дават началото на нов клон в рамките на споменатия клъстер или на самостоятелен нов клъстер.
10. Изолат BG2L2013/004 се намира в един клъстер със секвенциите на изолат JA4, JA10 и TTVCHN2, които са представители на генотип 2.
11. По отношение на другите две секвенции BG6B21P и BG1G751 се установява голяма разлика както по отношение на нашите така и по отношение на референтните секвенции. Те не се доближават до генотип 1,2 или 3.



## 7. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ПРЕДСТАВЕНИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД.

### Списък на публикациите:

1. Кълвачев, З., **К. Шишкова**, И. Цеков, Р. Павлов, С. Шишков. ТТ вирусите (сем.*Anelloviridae*): широко разпространени сред човешката популация, но все още с неизяснена патогенност. Военна медицина, бр. 3-4, 2012, 25-30.
2. **Shishkova K.**, I. Tsekov, R. Popov, S. Shishkov and Z. Kalvatchev. PCR Systems for Detection of Novel Elusive Human Pathogens Torque Teno Viruses (TTVs) in Bulgaria. *Compt. Rend. l'Acad. Bulg. Sci.*, Vol. 67, No8, 2014, 1175-1186. (IF=0.198).

### Списък на научните съобщения.

#### На международни форуми.

1. Kalvatchev, Z., I. Jzekov, **K. Shishkova**, R. Popov, and S. Shishkov. Distribution of Torque Teno Viruses (TTV) in healthy Bulgarian population. 5<sup>th</sup> Congr. Virology. 11-14 Sep. 2013, Lyon, France. *Virologie*, vol. 17, supp. 2, pp S224.
2. Kalvatchev Z., I. Tsekov, **K. Shishkova** and S. Shishkov. Sequence detection of Torque teno (TT) viruses: preliminary results among Bulgarian individuals. XXIII-rd Assembly of Inter. Medical Association Bulgaria (IMAB), 09 - 12 May, 2013, Varna, Bulgaria. Program, pp4.

#### На национални форуми.

1. **Шишкова, К.**, И. Цеков, Р. Попов, С. Шишков и З. Кълвачев. Разпространение на Torque Teno Virus (TTV) сред донори на кръв: предварителни резултати. XXI Нац. конгр. Клин. микробиол. инфекции, БАМ, 9-12 май, София, България, Сб. резюмета 15-16.

## **8. НАУЧНИ ПРИНОСИ.**

- Това е първото проучване, което доказва разпространението на TTV сред определени групи в българската популация.
- Адаптираната nested PCR система с LB1S/LB1R; LB2S/LB2R праймерни двойки е подходяща и ефективна за мащабни скринингови проучвания сред различни групи от българското население.
- От получените резултати можем да допуснем, че нашите TTV секвенции от здрави донори на кръв може би дават началото на нов клон в рамките на споменатия клъстер или на самостоятелен нов клъстер.