

VILNIAUS UNIVERSITETAS

EGLĖ AUKŠTUOLIENĖ

***HERPES SIMPLEX VIRUSO SU LATENCIJA SUSIJUSIO GENO  
PROMOTORIAUS SEKŲ ĮVAIROVĖ IR SAŠAJA SU KLINIKINIAIS  
POŽYMI AIS***

Daktaro disertacijos santrauka  
Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2005–2012 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Infekcinių, krūtinės ligų, dermatovenerologijos ir alergologijos klinikoje ir Uppsalos universiteto (Švedija) Medicinos mokslų departamento Klinikinės virusologijos padalinyje

**Mokslinis vadovas:**

Prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje**

**Pirmininkė:**

Doc. dr. Raimonda Matulionytė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

**Nariai:**

Prof. dr. Skaidra Valiukevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

Prof. dr. Donaldas Jonas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

Doc. dr. Matilda Bylaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

Dr. Danielius Serapinas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

**Oponentai:**

Prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B);

Dr. Vesta Kučinskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje, kuris įvyks 2013 m. kovo mėn. 8 d. 12 val. Vilniaus universitetinės ligoninės Santariškių klinikos Raudonojoje salėje.

Adresas: Santariškių 2, LT-08661, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiųsta 2013m. vasario mėn. 8 d.

Su disertacija galima susipažinti Vilniaus universiteto Centrinėje bibliotekoje ir Lietuvos medicinos bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

EGLĖ AUKŠTUOLIENĖ

**HERPES SIMPLEX VIRUS SEQUENCE VARIATION IN THE PROMOTER OF  
THE LATENCY ASSOCIATED GENE AND CORRELATION WITH  
CLINICAL FEATURES**

Summary of doctoral dissertation  
Biomedical sciences, Medicine (06 B)

Vilnius, 2013

The doctoral dissertation was developed in the Clinic of Infectious and Chest Diseases, Dermatovenereology and Allergology of Vilnius University Faculty of Medicine and Department of Medical Sciences, Section of Clinical Virology of Uppsala University (Sweden) in 2005-2012.

**Scientific Supervisor:**

Prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B)

**Dissertation to be defended at the Medical Research Council of Vilnius University Faculty of Medicine**

**Chairman:**

Assoc. prof. dr. Raimonda Matulionytė (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B)

**Members:**

Prof. dr. Skaidra Valiukevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Assoc. prof. dr. Matilda Bylaitė (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Dr. Danielius Serapinas (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

**Opponents:**

Prof. dr. Algirdas Utkus (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06 B);

Dr. Vesta Kučinskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical sciences, Medicine – 06 B).

The official defense of the dissertation will be held at the open session of the Medical Research Council on March 8, 2013 at 12.00 in the Red Hall of the Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos.

Address: Santariškių str. 2, LT-08661, Vilnius, Lithuania.

The mailing date of the summary of doctoral dissertation: February 8, 2013.

The dissertation is available in the Vilnius University Library and Lithuanian Medical Library.

## SANTRUMPOS

bp	bazių pora
PI	pasikliautinis intervalas
CNS	centrinė nervų sistema
CSS	cerebrospinalinis skystis
DNR	deoksiribonukleorūgštis
ELISA	imunofermentinė analizė (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
HSV	<i>herpes simplex</i> virusas
HSV-1	1 tipo <i>herpes simplex</i> virusas
HSV-2	2 tipo <i>herpes simplex</i> virusas
HNS	homopolimerinių nukleotidų sritys
IgG	imunoglobulinas G
kb	kilobazė
kPGR	kiekybinė polimerazės grandininė reakcija
LAT	su latencija asocijuotas transkriptas
LAP	su latencija asocijuoto geno promotorius
LPL	lytiškai plintančios ligos
nt	nukleotidas
ORF	atviras skaitymo rėmelis (angl. <i>open reading frame</i> )
<i>p</i>	statistinio reikšmingumo lygmuo
PGR	polimerazės grandininė reakcija
SSR	paprastos kartotinės sekos (angl. <i>Simple Sequence Repeat</i> )
ŠS	šansų santykis (angl. <i>odds ratio</i> )
VUL	Vilniaus universitetinė ligoninė

## 1. ĮVADAS

*Herpes simplex virusas* (HSV) yra vienas dažniausių žmogaus infekcinių patogenų, priklausančių *herpesviridae* šeimai. Remiantis viruso voko baltymų antigeninės struktūros skirtumais išskiriami du šio viruso tipai: pirmasis (HSV-1) ir antrasis (HSV-2) (Beauman, 2005).

HSV sukelia recidyvuojančią burnos-veido (dar vadinamąją lūpų pūslelinę) ir lytinių organų (Bloom ir kt., 2010) infekciją, kartais išplitusią ar sukeliančią vidaus organų pažeidimus ligą. Lytinių organų HSV infekcija yra viena iš labiausiai paplitusių lytiškai plintančių ligų (LPL) (Malvy ir kt., 2005), kurią dažniausiai sukelia HSV-2 (Gupta ir kt., 2007), tačiau daugėja HSV-1 sukeltų šios infekcijos atvejų, ypač tarp jaunų moterų (Lowhagen ir kt., 2002; Pebody ir kt., 2004). HSV-1 paprastai randamas veido ir burnos bėrimuose.

*Herpes simplex* virusas perduodamas glaudžiai kontaktuojant su sergančio asmens opelėmis ar skysčiais (seilėmis, pūslelių skysčiu), pvz., bučiuojantis, lytinių santykių metu. Didelė rizika užsikrėsti naujagimiams, kurių motinoms gimdymo metu buvo HSV sukeltų bėrimų (Whitley ir Roizman, 2009).

*Herpes simplex* virusas pasižymi savybe prasiskverbti į centrinę nervų sistemą (CNS) ir daugintis neuronuose (Whitley ir Roizman, 2009). Virusui patekus į sensorinius neuronus, infekcija tampa latentine ir lieka šeimtininko organizme visam laikui (Perng ir kt., 2002). Esant provokuojantiems faktoriams virusas gali reaktyvuotis ir nervais nukeliauti į odą ir/ar gleivines, kur sukelia bėrimus (Gupta ir kt., 2007). HSV infekcijos recidyvų dažnis yra individualus kiekvienam asmeniui (Whitley ir Roizman, 2009; Arduino ir Porter, 2008).

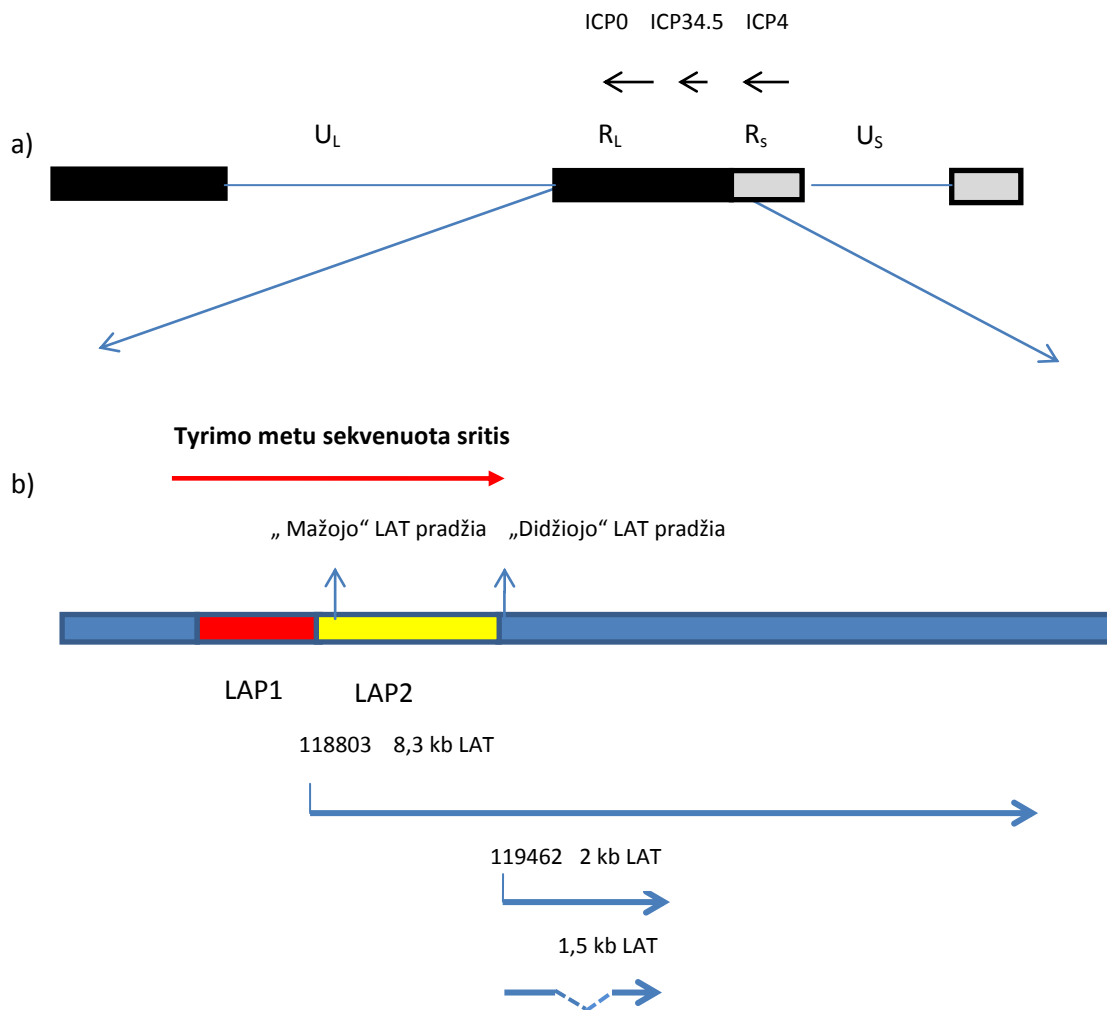
HSV infekcija yra plačiai paplitusi liga, tačiau tik nedaugeliui asmenų būdingas tipinis HSV sukeltas bėrimas (pūslelės ar opelės). Nustatyta, kad dauguma individų (tiek veido srities, tiek genitalinės HSV infekcijos atveju) neturėdami jokių klinikinių požymių išskiria virusą pakankamai kiekiams virusui perduoti. Tokiu būdu neatpažintos HSV infekcijos ir subklinikinis viruso išskyrimas yra pagrindinės HSV plitimo priežastys. Abiejų tipų virusų sukelti bėrimai kliniškai nesiskiria (Wald, 2006), tačiau HSV-2 genitalinės infekcijos atveju recidyvų dažnis yra didesnis (Solomon ir kt., 2003; Lafferty, 2002; Benedetti ir kt., 1999, Wald ir kt., 2002) ir subklinikinis viruso išskyrimas dažnesnis nei HSV-1 infekcijos atveju (Engelberg ir kt., 2003; Faber ir kt., 2011; Ashley ir kt., 1999; Pereira ir kt., 2012). Veido srities pažeidimų atveju analogiškas poveikis būdingas HSV-1 infekcijai (Wald ir kt., 2004).

HSV infekcija yra neišgydoma liga. Rinkoje esantys antivirusiniai vaistai slopina viruso dauginimąsi, tačiau negali sunaikinti latentinės infekcijos, glūdinčios juntamuosiuose ganglijuose (Knipe ir Cliffe, 2008). Taigi HSV infekcija vis dar išlieka visuomenės sveikatos problema tiek išsivysčiusiose, tiek besivystančiose šalyse (Słomka, 2000).

HSV latencijos išsivystymo ir palaikymo mechanizmai iki šiol nėra aiškūs (Perng ir kt., 2002; Perng ir Jones, 2010). Įrodyta, kad HSV genomus latencijos metu nėra visiškai „išjungtas“: visi genai yra supresuoti, išskyrus su latencija susijusį geną (LAT), nuo kurio nurašomas transkriptas yra vienintelis produktas, gausiai transkribuojamas latencijos metu (Stevens ir kt., 1987; Rock ir kt., 1987).

**LAT genas** yra HSV DNR ilgojoje pasikartojančių sekų atkarpoje (Perng ir kt., 2002; Wang ir kt., 1997; Krause ir kt., 1991). Pirminis LAT transkriptas („mažasis“

LAT) yra 8,3 kb ilgio ir nestabilus. Splaisingo metu iš pirminio transkripto iškerpamas 2 kb intronas, dar vadinams „stabiliuoju“ arba „didžiuoju“ LAT. Iš jo gali susidaryti 1,5 kb intronas (1 pav.)



**1 pav.** HSV-1 genomo ir LAT regiono schema (analogiškai yra ir HSV-2 genome):

- HSV genomas.  $U_L$  ir  $U_S$  – genomo ilgosios (L) (angl. *long*) ir trumposios (S) (angl. *short*) unikaliųjų sekų atkarpos.  $R_L$  ir  $R_S$  – genomo ilgosios (L) (angl. *long*) ir trumposios (S) (angl. *short*) pasikartojančių sekų atkarpos. Virusų ūmio fazės genų ICP0, ICP34,5 ir ICP4, kurie yra koduojami priešingoje negu LAT DNR grandinėje ir iš dalies sutampa su LAT genu, lokalizacija (Perng, 2010).
- HSV genomo pasikartojančių sekų sritis su LAT genu. LAT regiono žemėlapis: LAT promotoriai LAP1 ir LAP2. Pirminis 8,3 kb LAT transkriptas, 2 kb ir 1,5kb LAT intronai. Raudona rodyklė nurodo sritį, kuri buvo sekvenuota šiame tyrime.

**LAT genas atlieka kelias funkcijas:** slopina HSV infekcijos ūmios fazės genus (ICP0, ICP4, ICP34,5), skatindamas neaktyvaus heterochromatino susidarymą ant šių genų promotorių, inhibuoja neuronų apoptozę, daro įtaką latencijos įsitvirtinimui tam tikro tipo neuronuose. Apoptozės slopinimo funkcija koreliuoja su spontanine reaktyvacija.

**LAT promotorius.** LAT geno ekspresiją kontroliuoja LAT promotorius (LAP), t.y. trumpa DNR seka, prie kurios jungiasi DNR polimerazė ir pradeda LAT geno

nurašymą. Tiek HSV-1, tiek HSV-2 išskiriami du aktyvūs LAT promotoriai: LAP1 ir LAP2 (Chen ir kt., 1995, Goins ir kt., 1994). LAP1 turi TATA dėžutę bei kitus požymius, būdingus klasikiniam promotoriui, ir yra svarbus latencijos metu (Wang ir kt., 1997; Millhouse ir Wigdahl, 2000). LAP2 yra silpnesnis už LAP1, neturi TATA dėžutės ir yra aktyvesnis ūmios infekcijos metu (1 pav.).

Tyrimais nustatyta, kad tarp HSV-1 ir HSV-2 LAT promotoriaus mutantų reaktyvacijos dažnis mažesnis nei laukinio tipo HSV triušio (Perng ir kt., 1994, 1996), pelės (Perng ir kt., 2001) ir jūrų kiaulyčių (Krause, 1995) modeliuose. Iki šiol LAT promotoriaus tyrimai buvo atliekami naudojant mažų laboratorinių gyvūnėlių (pelės, triušio, jūrų kiaulytės) modelius. Ypač mažai tyrimų atlikta su HSV-2 (Wang ir kt., 1997). Nėra atlikta tyrimų, kurie nagrinėtų LAT promotoriaus sekų variaciją *herpes simplex* virusuose, išskirtuose iš žmonių klinikinių mėginių. Todėl nėra žinoma, ar ši variacija turi įtakos HSV reaktyvacijai ir infekcijos anatominei sričiai tarp žmonių.

**Transkriptai, koduojami LAT promotoriuje.** HSV-1 LAT promotoriuje ir 1,5 kb LAT koduojančiose sekose rasti tiesioginės krypties UOL (angl. *upstream of LAT*) (Naito ir kt., 2005), atvirkštinės krypties AL (angl. *antisense to LAT*) (Perng ir kt., 2002) genai, koduojantys baltymus, kurių funkcija latencijos reaktyvacijos cikle dar nėra aiški. Vėlesnių tyrimų metu HSV-1 LAT geno sekose rasta 2 atviri skaitymo rėmeliai (ORF) (angl. *open reading frame*) AL2 ir AL3, kurių funkcija taip pat nevisiškai iširta (Jaber ir kt., 2009; Perng ir Jones, 2010).

HSV-2 LAT koduojamose sekose 700 bazių atstumu nuo promotoriaus yra 3 atviri skaitymo rėmeliai (ORF) (Krause ir kt., 1991).

**MikroRNR, koduojamos LAT promotoriuje.** HSV-1 LAT koduoja 6 mikroRNR, iš kurių 2 (miR-H1 ir miR-H6) randamos LAT promotoriuje. HSV-2 LAT regione rastos 5 mikroRNR (Tang ir kt., 2008, 2009; Umbach ir kt., 2010). Manoma, kad šios RNR slopina ūmios fazės HSV genus (Perng ir Jones, 2010; Shen ir kt., 2009).

**Pasikartojančios DNR sekos.** DNR yra dinamiška struktūra. Svarbų vaidmenį jos nestabilume atlieka hipervariabilios pasikartojančios DNR sekos (Ramel, 1997), kurios randamos bet kuriame genome (Ouyang ir kt., 2012), tiek baltymus koduojančiose, tiek nekoduojančiose srityse (Usdin, 2008). Išskiriamos dviejų klasių pasikartojančios DNR: trumpos, iki 1-6 nukleotidų pasikartojančios sekos, vadinamos mikrosatelitais ar paprastomis kartotinėmis sekomis (SSR) (angl. *Simple Sequence Repeat*); ilgesnės, sudarytos iš 10-100 nukleotidų, vadinamos makrosatelitais (Gemayel ir kt. 2010; Kashi ir King, 2006). Mikrosatelitų variabilumą lemia kartotinio motyvo kopijų skaičiaus kitimai dėl mutacijų, kurios įvyksta DNR grandinei „slystelėjus“ replikacijos metu. Šio „slystelėjimo“ tikimybė tuo didesnė, kuo didesnis kartotinio motyvo pasikartojimų skaičius lokuse.

**Homopolimerinių nukleotidų sritys (HNS)** (angl. *homopolymer tracts*), dar vadinamos kartotinėmis mononukleotidų sekomis, daugumoje genomų sudaro gausiausią pasikartojančių sekų klasę (Kashi ir King, 2006). HNS sudarytos iš variabilaus skaičiaus pasikartojančio to paties nukleotido (pvz., GGGGGG).

Promotoriuose randamos tandemiškai pasikartojančios sekos veikia geno ekspresiją ir/ar geno funkciją, tokiu būdu gali sąlygoti įvairių fenotipų atsiradimą (Gemayel ir kt., 2010).

**Tyrimą sudaro klinikinė ir eksperimentinė dalys.** Jame nagrinėjamas HSV DNR kiekybinis ir kokybinis nustatymas, HSV tipavimas odos bėrimuose, genitalinės HSV infekcijos rizikos faktoriai ir LAT promotoriaus sekų įvairovė



klinikiniuose pacientų, kuriems yra HSV infekcija, mėginiuose. Lietuvos (Vilniaus) klinikiniai mėginiai, paimti iš lytinių organų ir veido srities, buvo tiriami klinikinėje tyrimo dalyje, atliekant polimerazės grandininę reakciją (PGR) ir serologinį ištyrimą, tuo tarpu tiek Lietuvos, tiek Švedijos (Upsalos) klinikiniai mėginiai buvo naudojami HSV LAT promotoriaus sekų analizei eksperimentinėje dalyje.

### **Mokslinio darbo tikslas:**

Įvertinti *herpes simplex* viruso LAT promotoriaus sekų įvairovę molekulinės diagnostikos metodais bei palyginti su HSV infekcijos klinikiniais požymiais.

### **Mokslinio darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti HSV tipą odos mėginiuose kiekybinės realaus laiko PGR metodu (kPGR).
2. Įvertinti galimus genitalinės HSV infekcijos rizikos faktorius.
3. Sukurti PGR metodą HSV LAT promotoriaus analizei atlikti; klonuoti sunkiai sekvenuojamas promotoriaus sritis.
4. Įvertinti HSV padermių LAT promotoriaus variabilias sritis, atsižvelgiant į recidyvų dažnį, anatominę sritį ir geografinį pasiskirstymą.

#### **1.1. Mokslinio darbo naujumas**

Šiame darbe pirmą kartą Lietuvoje atlikta HSV tipavimo ir HSV DNR kiekybinio ir kokybinio nustatymo odos mėginiuose analizė. Pirmą kartą Lietuvoje atlikta genitalinės HSV infekcijos rizikos veiksnių analizė.

Tai pirmas toks išsamus HSV LAT promotoriaus tyrimas pasaulyje. Sukurtas naujas HSV LAT promotoriaus PGR metodas. Pirmą kartą ištirta 145 klinikiniuose mėginiuose rasto *herpes simplex* viruso promotoriaus sekų įvairovė, atsižvelgiant į infekcijos recidyvų dažnį, anatominę sritį. Pirmą kartą atlikta filogenetinė analizė, palyginant tarp Lietuvos ir tarp Švedijos gyventojų aptinkamų HSV padermių LAT promotoriaus sritį.

#### **1.2. Mokslinio darbo praktinė reikšmė**

Per tyrimą nustatyta, kad HSV-2 yra pagrindinė lytinių organų HSV infekcijos priežastis, tačiau kai kurie pacientai nežinojo esantys užsikrėtę šiuo virusu (t.y. buvo HSV-2 seropozityvūs, tačiau niekada neturėję HSV infekcijos klinikinių požymių), todėl galėjo platinti *herpes simplex* virusą. Kadangi HSV infekcijos klinikiniai požymiai ne visada yra specifiški (ypač genitalinės HSV infekcijos atveju), o HSV tipo nustatymas daro įtaką ligos prognozei ir yra svarbus pacientams konsultuoti bei mokyti, todėl virusologiniai ir tipo-specifinės serologijos tyrimo metodai turėtų būti atliekami rutiniškai HSV diagnozei nustatyti ir norint atskirti HSV-1 infekciją nuo HSV-2 infekcijos. Neigiamas pradinis tyrimo rezultatas neatmeta HSV infekcijos diagnozės, todėl rekomenduojama kartoti tyrimus tolesnių ligos epizodų metu.

Pacientų informavimas apie HSV perdavimo riziką ir lytinės elgsenos mokymas galėtų padėti užkirsti kelią šiai infekcijai plisti. Atipinės HSV infekcijos atpažinimas padėtų išvengti tyrimų ir išlaidų tyrimams bei vaistams kitų ligų, kliniškai panašių į *herpes* infekciją, diagnostikai ir gydymui.

Per tyrimą rasta HSV LAT promotoriaus regione pasikartojančios DNR sritys, kurioms būdingas variabilumas tarp viruso padermių ir pačių padermių viduje. Kai šios sekos bus įkeltos į Genų banko duomenų bazę, ši informacija bus naudinga tolesniems HSV patogenezės, evoliucijos, latencijos ir reaktyvacijos moksliniams tyrimams, taip pat naujiems antivirusiniams vaistams kurti.

### 1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. HSV-2 dažniausiai randamas lytinių organų, HSV-1 – veido srities bėrimuose.

2. Ankstyvi lytiniai santykiai, lytinių partnerių skaičius gyvenimo bėgyje, kitos lytiškai plintančios ligos, oraliniai lytiniai santykiai – genitalinės HSV infekcijos rizikos faktoriai.

3. HSV LAT promotoriaus sekos yra variabilios ir skiriasi tarp HSV padermių ir pačių padermių viduje; variabilumas neturi sąsajos su HSV infekcijos anatomine sritimi, recidyvų dažniu, geografiniu HSV infekcijos paplitimu.

## 2. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR TYRIMO METODIKA

### 2.1. Tiriamoji medžiaga

#### Klinikinė tyrimo dalis

**Pacientai.** Į tyrimą įtraukti 54 pacientai, turintys tipinius (pūslelės, opelės, šašai) ir atipinius (eritema, dizurija, įtrūkimai) lytinių organų HSV infekcijos požymius bei 37 pacientai, turintys veido srities bėrimų, įtariant *herpes simplex* infekciją, apsilankę VUL Santariškių klinikos Dermatovenerologijos centre 2005-2012 m.

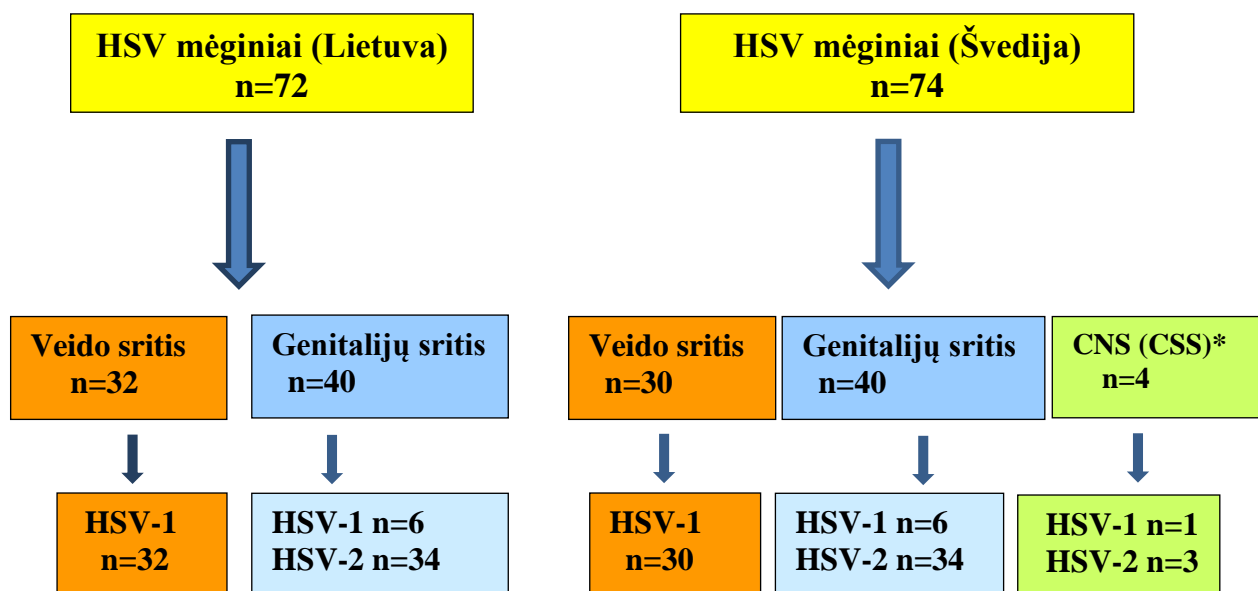
**Kontrolinę grupę** sudarė 50 sveikų asmenų grupė be jokių objektyvių ir subjektyvių *herpes* infekcijos požymių (asmenys, 2006 m. atėję į Respublikinę tuberkuliozės ir infekcinių ligų universitetinę ligoninę skiepytis).

#### Eksperimentinė tyrimo dalis

**Klinikiniai mėginiai.** Iš viso HSV LAT promotoriaus analizei atlikti buvo surinkti 146 klinikiniai mėginiai. Septyniasdešimt du HSV mėginiai iš Lietuvos buvo surinkti VUL Santariškių klinikų Dermatovenerologijos centre iš pacientų veido ir lytinių organų bėrimų. Septyniasdešimt keturi HSV teigiami mėginiai iš Švedijos atrinkti iš mėginių, kurie buvo surinkti Upsalos universitetinės ligoninės Dermatologijos klinikoje ir pristatyti ištirti į Upsalos universiteto Klinikinės mikrobiologijos departamento laboratoriją.

Tarp 72 pacientų iš Vilniaus 32 HSV-1 mėginiai buvo iš veido-burnos srities ir 6 HSV-1– iš lytinių organų pažeidimų. HSV-2 buvo rastas 34 pacientų genitalijų bėrimuose. Tarp 74 mėginių iš Upsalos 30 mėginių iš veido-burnos srities ir 6

mėginiuose iš lytinių organų bėrimų rastas HSV-1, 34 genitaliniuose mėginiuose rastas HSV-2. Keturi mėginiai buvo gauti iš pacientų, kuriems buvo CNS infekcija (encefalitas - HSV-1 ir meningitas - HSV-2). *Herpes simplex* virusas bėrimuose buvo nustatytas atlikus kiekybinę realaus laiko PGR (2 pav.).



2 pav. HSV mėginiai (n=146), panaudoti tiriant LAT promotorių  
\*CNS – centrinė nervų sistema; CSS – cerebrospinalinis skystis

## 2.2. Tyrimo metodika

**Klinikinė tyrimo dalis (Lietuvos pacientai).** Mėginiai iš odos pažeidimų ištirti atliekant kiekybinę realaus laiko polimerazės grandininę reakciją bei nustatant *herpes simplex* viruso tipą ir kiekį. Pacientų ir kontrolinių asmenų kraujo mėginiai ištirti imunofermenčiu (ELISA) metodu antikūnams prieš 1 ir 2 tipo *herpes simplex* virusą aptikti. Visi dalyviai užpildė pateiktą anketą apie sociodemografinius duomenis, *herpes simplex* infekciją ir lytiškai plintančias ligas anamnezėje bei seksualinius įpročius.

**Eksperimentinė tyrimo dalis.** HSV LAT promotoriaus analizė atlikta ištyrus HSV padermes, išskirtas iš Lietuvos (Vilniaus) ir Švedijos (Upsalos) pacientų klinikinių mėginių.

### Klinikinė tyrimo dalis

**Mėginių paėmimas.** Tepinėliai HSV nukleino rūgštims nustatyti (kPGR) buvo paimti stipriai įtrinant medvilninį tamponėlį į pažeistą odą ar gleivinę pacientų, turinčių *herpes simplex* infekcijos klinikinių ar atipinių požymių, duodančių pagrindą įtarti šią infekciją. Iš kiekvieno paciento buvo paimti 2 mėginiai: vienas medvilninis tamponas iki ištyrimo buvo laikomas užšaldytas - 20°C PGR buferiniame tirpale (0,4 ml 10 mmol/L Tris-HCL buferinis tirpalas su 10 mmol EDTA), kitas – sausame mėgintuvėlyje

kambario temperatūroje. Ankstesnis tyrimas (Filén ir kt., 2004) parodė, kad paprastu tamponėliu paimtos medžiagos laikymas sausame mėgintuvėlyje kambario temperatūroje leidžia nustatyti HSV DNR ir šis metodas buvo taikomas šiame tyrime. Sausame mėgintuvėlyje esanti tyrimo medžiaga buvo ištirta ir palikta atsargai, nepavykus gauti pakankamai viruso DNR iš pirmojo bandinio.

**DNA išskyrimas** atliktas naudojant *QIAgen DNA Blood Mini Kit* rinkinį (QIAgen, Hildenas, Vokietija) ir atsižvelgiant į gamintojo nurodytas instrukcijas.

**Kiekybinė realaus laiko PGR** nustatyti HSV ir jo tipą buvo atlikta Filén ir kt. aprašytu metodu (Filén ir kt., 2004). Galutinis reakcijos tūris buvo 50 µl (naudotas *TaqMan Universal PCR Master Mix* mišinys (Applied Biosystems, Foster Sitis, Kanada)). PGR buvo atlikta naudojant 10 µl DNR; kiekvieno mėginio reakcijos tūris - 50 µl. Reakcija buvo įvykdyta automatiniam *RotorGene 2072* sistemos amplifikatoriuje (Corbett Research, Northlake, Australia) tokiomis sąlygomis: 50°C – 3 minutės, 95°C – 10 minučių, toliau 45 ciklai 95°C 15 – sekundžių ir 57°C – 60 sekundžių.

**Serologija.** Iš į tyrimą įtrauktų pacientų ir kontrolinių asmenų buvo paimta kraujo iš venos anti-HSV-1 IgG ir anti-HSV-2 IgG serologinei imunofermenetinei (ELISA) analizei atlikti, norint atskirti pirminę HSV infekciją nuo recidyvo bei nustatyti besimptomius HSV infekcijos nešiotojus. Nucentrifugavus kraują, gautas serumas iki ištyrimo buvo laikomas - 20° C temperatūroje. HSV-1 ir HSV-2 antikūnai iširti imunofermeninės analizės (ELISA) meodu (HerpeSelect<sup>®</sup>, Focus Diagnostics, Kalifornija, JAV) atsižvelgiant į gamintojo nurodytas instrukcijas.

**Anketa.** Visi dalyviai užpildė pateiktą anoniminę anketą apie sociodemografinius duomenis, HSV infekciją ir lytiškai plintančias infekcijas anamnezėje bei seksualinius įpročius. Anketos duomenys buvo reikalingi genitalinės HSV infekcijos rizikos faktoriams ir recidyvų dažniui įvertinti.

## **Eksperimentinė tyrimo dalis**

**HSV DNR išskyrimas iš mėginių, surinktų Švedijoje, ir kiekybinė realaus laiko PGR** buvo atlikta, kaip aprašyta klinikinės tyrimo dalies metoduose.

**HSV LAT promotoriaus amplifikacija (specifinė PGR).** HSV DNR, gauta iš odos ir gleivinių pažeidimų bei cerebrospinalinio skysčio, buvo panaudota LAT geno promotoriui iširti. LAT geno promotoriaus sričiai pagausinti buvo sukurtas naujas PGR metodas atskirai tiek HSV-1, tiek HSV-2.

PGR pradmenys buvo parinkti pagal Genų banko (NCBI) HSV referentines sekas NC\_001806 (HSV-1 17 padermė) ir NC\_001798 (HSV-2 HG52 padermė), publikuotas internete ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). PGR pradmenys promotoriui pagausinti ir sekoskaitai atlikti buvo išanalizuoti OLIGOAnalyzer1.0.2. programa ir užsakyti susintetinti *Thermo Fisher Scientific* kompanijoje (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulmas, Vokietija). HSV-1 ir HSV-2 pradmenų sekos nurodytos 1 ir 2 lentelėse.

Norint pagausinti LAT promotoriaus sritį atlikta „touchdown“ karšto starto PGR, kurios tūris buvo 25 µl. PGR rekcijai naudota 0,2 mM dNTP, kiekvieno iš pradmenų po 300 nm, 1xQ tirpalo ir 1,25 vienetai *Hotstar Taq* polimerazės 1xPGR buferiniame tirpale (QIAgen, Hildenas, Vokietija). PGR sąlygos: 15 min. 95°C preinkubacija, toliau – 12 ciklų DNR denatūracijos 98°C temperatūroje 30 s, pradmenų prijungimas palaipsniui mažinant temperatūrą 1°C kas 1 ciklą nuo 67°C iki 56°C 45 s ir

DNR sintezė 72°C temperatūroje 1min. 30 s, toliau – 25 ciklai 98°C 30 s, 57°C 45 s ir 72°C 1 min. 30 s. Po to reakcijos mišinys buvo inkubuotas 72°C temperatūroje 5 min.

Esant mažam HSV kopijų skaičiui, buvo atlikta HSV-1 ir HSV-2 lizdinė karšto starto PGR, panaudojant aukščiau aprašytus PGR pradmenis ir reakcijos sąlygas. Pirmoji PGR buvo atlikta su 5 µl DNR iš kiekvieno mėginio reakcijos tūriams esant 25µl. Antroji PGR buvo atlikta su 2 µl PGR pagausinto produkto iš pirmosios reakcijos reakcijos tūriams esant 25 µl.

**1 lentelė. HSV-1 LAT promotoriui amplifikuoti ir sekvenuoti naudoti pradmenys**

Pradmuo (nt. pozicija)	Funkcija	Tipas	Seka (5'→3')
117970-117990	I PGR, sek.	T	GCAAGAACAGACACGCAGAAC
119635-119615	I PGR, sek.	A	CGGACGGGTAAGTAACAGAGT
117982-117999	I PGR, II PGR, sek.	T	ACGCAGAACGGCTGTGTT
118142-118160	I PGR, II PGR, sek.	T	CCAGTCTCCTCGCCTTCTC
118768-118749	II PGR, sek.	A	AGATGACGCAGCAAAAACAG
118631-118648	II PGR, sek.	T	TGCCCGCGAGATATCAAT
119581-119562	I PGR, II PGR, sek.	A	GCTGGTGTGCTGTAACACGA
118252-118273	sek.	T	GATCCCGACAACAATAACAACC
118279-118258	sek.	A	CGTTGGGGTTGTTATTGTTGTC
118347- 118334	sek.	A	ACTTCCACTTCCCGTCCTTC
118543-118523	sek.	A	CGGCCACATAAACAATGACTC
118749-118768	sek.	T	CTGTTTTTGCTGCGTCATCT
119018-119038	sek.	T	GGAATGTTTCGTTTCGTCTGTC
119183-119202	sek.	T	GATRAACAMTCGGGGTTACC
119202-119183	sek.	A	GGTAACCCCGAKTGTTYATC
119288-119303	sek.	A	AAACCACAGCGCATGC
119480 -119459	sek.	A	GCAGGTGTCTAACCTACCTGGA

**Pastabos:** Pradmenų sekos nurodytos, kaip užsakant sintezei. IUPAC grupiniai kodai, reiškiantys daugiau negu vieną nukleotidą: Y yra C arba T, M yra A arba C. PGR pradmenys parinkti pagal Genų banko (NCBI) referentinės HSV-1 padermės 17 seką (NC\_001806). nt., nukleotidas; sek., sekvenavimas; T, tiesioginis pradmuo; A, atvirkštinis pradmuo

**2 lentelė. HSV-2 LAT promotoriui amplifikuoti ir sekvenuoti naudoti pradmenys**

Pradmuo (nt. pozicija)	Funkcija	Tipas	Seka (5'→3')
119022-119041	I PGR, II PGR, sek.	T	AAAGCAACGGGAAAGAGAGG
120357 -120340	I PGR, sek.	A	CCGCCTCGTGTCTTCTGA
119189-119209	II PGR, sek.	T	CCTGTGTCATTGTTTACGTGG
119432-119451	II PGR, sek.	T	GTGTTGYTGTGGGCATTTCT
120065-120045	II PGR, sek.	A	GAAATGTGAGGAGAGCGAGAC
120260-120222	II PGR, sek.	A	CTCAGCAGAAGCTCACCTGTA
119463-119445	sek.	A	GGATGACGCAGCAGAAAATG
119359-119376	sek.	T	CTGAGTGCTCTGCGGTTG
119783-119801	sek.	T	CGGAGGCTTTTTTMGATTC
119804-119786	sek.	A	CGGGAATCGAAAAAAGCCT

**Pastabos:** Pradmenų sekos nurodytos, kaip užsakant sintezei. IUPAC grupiniai kodai, reiškiantys daugiau negu vieną nukleotidą: Y yra C arba T, M yra A arba C. PGR pradmenys parinkti pagal Genų banko (NCBI) referentinės HSV-2 padermės HG52 seką (NC\_001798). nt. - nukleotidas; sek., - sekvenavimas; T - tiesioginis pradmuo; A - atvirkštinis pradmuo

Gauti amplifikacijos produktai buvo atskiriami 1,5% agarozės gelyje, turinčiame etidžio bromido, 100 V 1 val. ir fotografuojami ultravioletinėje šviesoje. Amplifikuoti laukiamo dydžio LAT geno promotoriaus fragmentai išgryninti iš 1,5%

agarozės gelio, naudojant *PCR purification kit* (QIAGEN, Hildenas, Vokietija) arba *Gel Extraction kit* (QIAGEN, Hildenas, Vokietija) rinkinius. Pastarasis rinkinys buvo naudojamas tuo atveju, jei gelyje buvo keli DNR fragmentai; laukiamo dydžio fragmentas buvo išpjautas iš gelio.

**HSV LAT promotoriaus sekoskaita.** Pagausintos DNR sekos buvo nustatytos fluorescenciškai žymėtų terminatorių (ddNTP) metodu naudojant sekvenavimo rinkinį *ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Foster Sitis, CA, JAV). Sekvenavimo PGR reakcija buvo atlikta pagal gamintojo rekomendacijas, išskyrus tai, kad į reakcijos mišinį papildomai pridėta 4 µl 1M betaino (Sigma Aldrich Švedija AB, Stokholmas, Švedija). Amplifikacijos reakcija atlikta *GeneAmp PCR system 9700* amplifikatoriuje (Applied Biosystems, Foster Sitis, CA, JAV) tokiomis sąlygomis: pradinė denatūracija – 96°C temperatūroje 2 min, toliau – 35 ciklai denatūracijos 98°C temperatūroje 20 s, pradmenų prijungimo 50°C temperatūroje 10 s ir DNR sintezės 60°C temperatūroje 4 min. Toliau – reakcijos produktų išgryninimas etanoliu pagal gamintojo pateiktą metodiką. HSV LAT promotoriaus sekos buvo nustatytos automatinio genetiniu analizatoriumi ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster Sitis, Ca, JAV) Upsalos universiteto Medicinos mokslų departamento virusologijos padalinyje arba automatinio genetiniu analizatoriumi ABI 3730XL (Applied Biosystems) Upsalos genomo centre.

**HSV LAT promotoriaus sekų klonavimas.** Pagausinti ir išgryninti tiriamieji HSV LAT fragmentai, kurių nepavyko sekvenuoti dėl sudėtingos DNR sekos, buvo klonuoti į TOPO<sup>®</sup>TA vektorių ir transformuoti į *Escherichia coli* ląsteles (TOPO 10) naudojant *TOPO<sup>TM</sup>TA Cloning kit* (Invitrogen, Stokholmas, Švedija) klonavimo rinkinį. Rekombinantinės plazmidės buvo išgrynintos naudojant *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hildenas, Vokietija) rinkinį, atsižvelgiant į gamintojo instrukcijas. Plazmidžių DNR koncentracija buvo nustatyta *NanoDrop ND-1000* spektrofotometru (NanoDrop technologies, Vilmingtonas, DE, JAV). Gautų klonavimo produktų sekos buvo nustatytos naudojant *ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction Kit* sekvenavimo rinkinį, kaip aprašyta anksčiau.

**Daugybinis sekų palyginimas ir filogenetinė analizė.** Sekvenavimo duomenys išanalizuoti naudojant *DNA Baser v2.80.0* (HeracleSoftware, Lilienthalis, Vokietija) programą. Daugybinis sekvenuotų sekų palyginimas atliktas naudojantis *ClustalW2*, *ClustalW1.83* arba *MUSCLE* kompiuterinėmis programomis. Kladogramos (pateiktos tik disertacijos medžiagoje) buvo sukurtos atlikus daugybinį sekų sgreitinimą naudojant *ClustalW1.83* programą pagal *nearest-neighbor* algoritmą ir pateiktos naudojant *TreeView* programą (Page, 1986). Filogramos (filogenetiniai medžiai) sukurtos naudojant *MUSCLE* (Edgar RC, 2004) sekų palyginimo metodą ir *MEGA* programą (Tamura ir kt., 2011).

Palygintų tarpusavyje HSV LAT promotoriaus sekų panašumas buvo pavaizduotas grafiškai naudojant *SimPlot* programą (Lole ir kt., 1999).

### 2.3. Statistinė analizė

Gauti duomenys buvo išanalizuoti naudojant aprašomąją statistiką. Kiekybinių kintamųjų aprašomoji statistika pateikiama vidurkių – standartinių nuokrypių (vid.± SN) pavidalu, kokybinių – absoliutaus skaičiaus (n) ir procentinės

dalis (%) pavidalu. Lyginant dvi grupes kiekybinio kintamojo atžvilgiu, taikytas t-testas arba neparametrinis *Man-Whitney* testas (jei duomenys yra nepasiskirstę tolygiai). Kategoriniams duomenims analizuoti naudotas chi kvadrato ( $\chi^2$ ) ir Fišerio tikslusis metodas.

Lytinių organų HSV infekcijos rizikos veiksniams įvertinti taikytas binarinės logistinės regresijos metodas (taikytas standartinis modelio sudarymo būdas (enter)). Priklausomu kintamuoju ėmėme kintamąjį, indikuojantį ligos buvimą (genitalinę HSV infekciją), įvykiu laikytas lytinių organų *herpes* virusinės infekcijos buvimas. Kintamosios į modelį buvo atrinktos, kai gauta p reikšmė buvo  $<0,25$ . Tačiau modelyje buvo panaudotos kintamosios, kurios buvo kliniškai svarbios, nepaisant statistinio reikšmingumo. Taip buvo siekiama užtikrinti trikdančiųjų veiksnių kontrolę. Modelio atitikimo duomenims įvertinti naudotas modelio suderinamumo  $\chi^2$  kriterijus, *Hosmer-Lemshov* testas, klasifikacinė lentelė. Koeficiento  $\beta$  reikšmingumas vertintas Wald testu.

Statistinio reikšmingumo lygmuo buvo pasirinktas  $\alpha = 0,05$ ; rezultatai buvo vertinami kaip statistiškai reikšmingi, kai  $p \leq 0,05$ .

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „SPSS 19.0“ kompiuterinę programą.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. Klinikinė tyrimo dalis

*Herpes simplex* infekcijos diagnozė nustatyta remiantis PGR ir serologinio tyrimo rezultatais. Pacientų, kuriems laboratoriniais tyrimais buvo patvirtinta HSV infekcijos diagnozė, grupė buvo lyginta su kontroline grupe.

##### 3.1.1. Lytinių organų HSV infekcija

***Lytinių organų HSV infekcijos diagnozė.*** *Herpes simplex* infekcija diagnozuota 45/54 (83,3 proc.) pacientams: virusas nustatytas 40/54 (74,1 proc.) asmenims odos ir gleivinių bėrimuose PGR metodu; 5 pacientų serume rasti anti-HSV-2 IgG antikūnai, nors polimerazės grandininė reakcija buvo neigiama.

***Populiacijų charakteristika.*** Pacientų grupę, kuriems diagnozuota HSV genitalinė infekcija, sudarė 17 (37,8%) vyrų ir 28 (62,2%) moterys, amžiaus vidurkis  $35,7 \pm 12,3$ . Kontrolinę grupę sudarė 15 (30%) vyrų ir 35 (70%) moterys, amžiaus vidurkis  $39,4 \pm 10,3$ .

Pacientų ir kontrolinių asmenų sociodemografiniai duomenys pateikti 3 lentelėje. Dauguma pacientų ir kontrolinės grupės asmenų buvo vedę/ištekėję ar turėjo nuolatinį partnerį/ę, aukštąjį išsilavinimą ir buvo dirbantys. Abi grupės, ir tiriamoji, ir kontrolinė, buvo homogeniškos amžiaus, lyties, išsilavinimo ir socialinės padėties atžvilgiu.

**3 lentelė. Pacientų ir kontrolinių asmenų, kuriems diagnozuota genitalinė HSV infekcija, sociodemografiniai duomenys**

	Pacientai, kuriems diagnozuota genitalinė HSV infekcija	Kontrolinės grupės asmenys	p reikšmė
Iš viso	n=45	n=50	
<b>Lytis:</b>			
1. Vyras	17 (37,8 %)	15 (30 %)	0,516 <sup>1</sup>
2. Moteris	28 (62,2 %)	35 (70 %)	
<b>Amžius:</b>			
1. Vidurkis, m.	35,7±12,3	39,4±10,3	0,122 <sup>2</sup>
2. Ribos, m.	18-65	20-58	
<b>Išsilavinimas:</b>			
1. Aukštasis	24 (53,4 %)	22 (44 %)	0,103 <sup>1</sup>
2. Aukštesnysis	6 (13,3 %)	16 (32 %)	
3. Vidurinis	15 (33,3 %)	12 (24 %)	
<b>Šeimyninė padėtis:</b>			
1. Nevedęs/netekėjusi	18 (40 %)	9 (18 %)	0,208 <sup>1</sup>
2. Vedęs ar partnerystės statuso	18 (40 %)	33 (66 %)	
3. Našlys ar išsiskyres/usi	9 (20 %)	8 (16 %)	
<b>Socialinė padėtis:</b>			
1. Dirbantis	33 (73,3 %)	46 (92 %)	0,081 <sup>1</sup>
2. Bedarbis	4 (8,9 %)	2 (4 %)	
3. Studentas	6 (13,3 %)	2 (4 %)	
4. Pensininkas	2 (4,5 %)	0 (0 %)	

<sup>1</sup>Fišerio tikslusis testas, <sup>2</sup>t-testas

**Lytinių organų HSV infekcijos rizikos veiksniai.** Reikšmingiausi rizikos veiksniai (4 lentelė), kurie didina santykinę HSV genitalinės infekcijos riziką, yra lytinio debiuto pradžia, lytinių partnerių skaičius, lytiškai plintančioa ligos (LPL) ir oraliniai lytiniai santykiai.

Nepaisant to, kad nebuvo statistiškai reikšmingo skirtumo lyties atžvilgiu abiejose grupėse, ši kintamoji buvo įtraukta į rizikos veiksnių vertinimą, kadangi moteris labiau linkusios sirgti lytinių organų *herpes* virusine infekcija negu vyrai. Mūsų duomenys rodo stiprų tiesioginį ryšį tarp genitalinės HSV infekcijos ir LPL anamnezėje bei oraliųjų lytinių santykių. LPL didina genitalinės HSV infekcijos riziką beveik 8 kartus (ŠS 7,76; 95 proc. PI 2,53 - 23,79), oraliniai lytiniai santykiai – 6,6 karto (ŠS 6,57; 95 proc. PI 2,47-14,47) Lytinio debiuto amžius buvo suskirstytas į 4 kategorijas. Pacientai (amžiaus kategorijos ≤16 ir 17-18 metų) jaunesniame amžiuje pradėdavo lytinį gyvenimą, palyginti su kontrolinės grupės dalyviais. Turėtų lytinių partnerių skaičius taip pat buvo suskirstytas į 4 kategorijas, tačiau tik kategorija „10 ir daugiau turėtų partnerių“ buvo tiesiogiai susijusi su genitaline HSV infekcija (ŠS 5,38; 95 proc. PI 1,36 - 21,30).

Išsilavinimas ir socialinė padėtis nebuvo įtraukti į rizikos veiksnių vertinimą, kadangi nebuvo statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pacientų ir kontrolinės grupės dalyvių.



Kontrolinės grupės asmenys nurodė dažnesnį prezervatyvų naudojimą, palyginti su pacientais (19/50 (38%) ir 9/45 (20%),  $p < 0,001$ ). Kontaktų su komerciniais sekso darbuotojais dažnis buvo panašus abiejose grupėse (3 iš 45 (6,7%) pacientų ir 4 iš 50 (8%) kontrolinių asmenų,  $p = 1,000$ ).

#### 4 lentelė. Genitalinės HSV infekcijos rizikos veiksniai

	ŠS <sub>n</sub> (95% PI)	p reikšmė	ŠS <sub>a</sub> (95% PI)	p reikšmė
<b>Lytis</b>	1,42 (0,60-3,33)	0,424	1,07 (0,39 - 2,97)	0,891
<b>LPI anamnezėje</b>	7,01 (2,84-17,34)	0,000	7,76 (2,53 - 23,79)	0,000
<b>Oraliniai lytiniai santykiai</b>	7,07 (2,86-17,47)	0,000	6,57 (2,47-14,47)	0,000
<b>Lytinis debiutas</b>				
≥22 m.	1,0	0,005	1,0	0,023
≤16 m.	12,00 (2,16 - 66,55)	0,004	9,11 (1,42 - 58,46)	0,020
17-18 m.	8,55 (2,27-32,22)	0,002	8,32 (1,96 - 35,37)	0,004
19-21 m.	3,32 (0,92 - 11,98)	0,067	3,68 (0,91 - 14,89)	0,068
<b>Turėtų lytinių partnerių skaičius</b>				
1	1,0	0,047	1,0	0,067
2-4	1,40 (0,46 - 4,23)	0,554	1,3 (0,42 - 3,99)	0,651
5-9	3,10 (0,82 - 11,44)	0,096	2,38 (0,6 - 9,43)	0,218
≥10	5,57 (1,42 - 21,86)	0,014	5,38 (1,36 - 21,3)	0,016

ŠS - šansų santykis (ŠS<sub>n</sub>-neadaptuotas, ŠS<sub>a</sub> – adaptuotas pagal lytį, LPL, oralinius lytinius santykius anamnezėje, lytinį debiutą ir turėtų lytinių partnerių skaičių), PI - pasikliautiniai intervalai

Maždaug pusė pacientų (22/45 (48.9%)) ir kontrolinės grupės dalyvių (28/50 (56%),  $p = 0,541$ ) nurodė lūpų pūslelinę anamnezėje. Du (4 %) asmenys iš kontrolinės grupės teigė turėję genitalinės HSV infekcijos bėrimų praeityje.

**Serologinė analizė.** Dauguma pacientų ir asmenų iš kontrolinės grupės turėjo anti-HSV-1 IgG antikūnų. Kaip ir tikėtasi, anti-HSV-2 IgG antikūnų turėjo reikšmingai daugiau pacientų nei asmenų iš kontrolinės grupės (5 lentelė).

#### 5 lentelė. Pacientų, kuriems diagnozuota HSV genitalinė infekcija, ir kontrolinės grupės asmenų serologija

	Pacientai, kuriems diagnozuota genitalinė HSV infekcija	Kontrolinės grupės asmenys	p reikšmė <sup>1</sup>
<b>Iš viso</b>	n=45	n=50	
<b>Anti-HSV-1 IgG serologinis tyrimas:</b>			
<b>Teigiamas</b>	39 (86,7 %)	45 (90 %)	0,751
<b>Neigiamas</b>	6 (13,3 %)	5 (10 %)	
<b>Anti-HSV-2 IgG serologinis tyrimas:</b>			
<b>Teigiamas</b>	31 (68,8 %)	7 (14 %)	0,000
<b>Paribinis</b>	1 (2,2 %)	0 (0 %)	
<b>Neigiamas</b>	13 (28,8 %)	43 (86 %)	

<sup>1</sup>Fišerio tikslusis testas

**Lytinių organų HSV infekcijos klinika, HSV DNR nustatymas bėrimuose ir serologija.** Mėginiai iš odos ir gleivinių bėrimų ištirti kiekybinės realaus laiko PGR metodu. HSV DNR nustatyta 40/54 (74,1 %) pacientų: 14 (35%) vyrų ir 26 (65%) moterų. *Herpes simplex 2* tipo virusas rastas 34/40 (85 %) mėginiuose, 1 tipo - tik 6/40 (15 %) mėginiuose (6 lentelė).

**6 lentelė. Pacientų, kuriems diagnozuota genitalinė HSV infekcija, klinikiniai aspektai**

	Pacientai, kurių PGR teigiama	Pacientai kurių PGR neigiama
<b>Iš viso</b>	n=40	n=5
<b>Lytis: 1. Vyrų</b>	14 (35 %)	2 (40 %)
<b>2. Moterų</b>	26 (65 %)	3 (60 %)
<b>Amžius:</b>		
<b>1. Vidurkis, m.</b>	36,33±12,59	31,0±9,3
<b>2. Ribos, m.</b>	18-65	21-47
<b>1.Pirmasis HSV infekcijos epizodas</b>	14 (35 %)	3 (60 %)
<b>2. Recidyvas</b>	26 (65 %)	2 (40 %)
<b>Pūslelės, opelės:</b>		
<b>1. Taip</b>	39 (97,5 %)	3 (60 %)
<b>2. Ne</b>	1 (2,5 %)	2 (40 %)
<b>Epizodo trukmė :</b>		
<b>1. &lt; 5 d.</b>	26 (65 %)	0 (0 %)
<b>2. ≥ 5 d.</b>	14 (35 %)	5 (100 %)
<b>HSV tipas</b>		
<b>HSV-1</b>	6 (15 %)	
<b>HSV-2</b>	34 (85 %)	
<b>Anti-HSV-1 IgG serologinis tyrimas:</b>		
<b>Teigiamas</b>	34 (85 %)	5 (100 %)
<b>Neigiamas</b>	6 (15 %)	0 (0 %)
<b>Anti-HSV-2 IgG serologinis tyrimas:</b>		
<b>Teigiamas</b>	26 (65 %)	5 (100 %)
<b>Paribinis</b>	1 (2,5 %)	0 (0 %)
<b>Neigiamas</b>	13 (32,5 %)	0 (0 %)

<sup>1</sup>Fišerio tikslusis testas

Keturiolika pacientų (35%) nurodė genitalinės HSV infekcijos **pirmąjį epizodą**, kurio trukmė buvo nuo 1 dienos iki 3 savaitių: keturių pacientų (29%) mėginiuose rastas HSV-1, 10 (71%) mėginių – HSV-2.

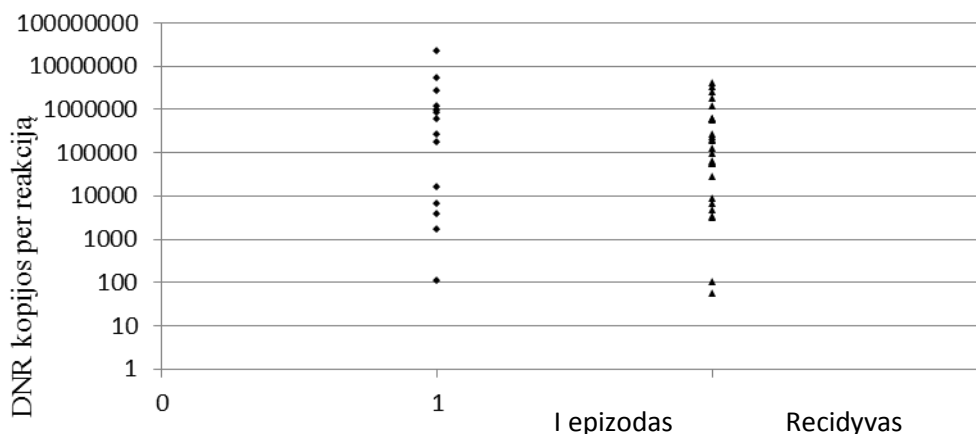
Dvidešimt šešioms pacientams (65%) pasireiškė HSV infekcijos **recidyvas**: HSV-1 rastas 2 (8%), HSV-2 – 24 (92%) pacientų bėrimų mėginiuose. Recidyvuojančių bėrimų trukmė buvo nuo 1 iki 14 dienų.

Trisdešimt devyni (97,5 proc.) iš 40 pacientų, kurių PGR buvo teigiama, turėjo matomas pūsleles ir/ar opelės mėginio paėmimo metu, 26 (65 proc.) pacientams

bėrimų trukmė buvo trumpesnė nei 5 dienos. Visų pacientų, kurių PGR buvo neigiama, bėrimų trukmė iki mėginio paėmimo buvo ilgesnė nei 5 dienos, 3 (60 proc.) asmenys turėjo matomas opeles.

Iš 40 pacientų, kurių HSV DNR rezultatas buvo teigiamas, 26 (65%) serume buvo rasta anti-HSV-2 IgG antikūnų. Visi penki pacientai, kurių bėrimuose *herpes simplex* viruso nerasta, turėjo antikūnų prieš HSV-2 (6 lentelė).

Viruso kopijų skaičius recidyvuojančiuose genitalijų bėrimuose svyravo nuo 56 iki  $3,9 \times 10^6$  (mediana  $1,2 \times 10^5$ ) DNR kopijų vienos PGR reakcijos metu ir buvo mažesnis nei pirmojo epizodo metu (ribos  $10^6$ - $2,2 \times 10^7$ , mediana  $2,6 \times 10^5$ ), tačiau šis skirtumas buvo statistiškai nereikšmingas (*Mann-Whitney U* testas:  $U=154$ ,  $p = 0,535$ ) (3 pav.).



**3 pav.** HSV DNR kopijų skaičius vienos PGR reakcijos metu lytinių organų bėrimuose

### 3.1.2. Veido srities HSV infekcija

**Veido srities HSV infekcijos diagnozė.** Iš 37 pacientų, kuriems įtarta *herpes simplex* infekcija veido srityje, mėginių HSV rastas 32 (86,5%) mėginiuose. Trisdešimt penkių pacientų serume rasta anti-HSV-1 antikūnų. Dvieju pacientai, kurių PGR buvo neigiama, serologinis tyrimas taip pat buvo neigiamas (kraujyje nerasta nei anti-HSV-1 IgG, nei anti-HSV-2 IgG). Todėl veido srities HSV infekcija buvo diagnozuota 35 pacientams.

**Populiacijų charakteristika.** Pacientų grupę (35), kuriems diagnozuota HSV veido srities infekcija, sudarė 12 (34%) vyrų ir 23 (66%) moterys, amžiaus vidurkis  $39,1 \pm 15,7$ . Sociodemografiniai pacientų, kuriems diagnozuota veido HSV infekcija, ir kontrolinės grupės asmenų duomenys parodyti 7 lentelėje. Abi grupės reikšmingai nesiskyrė amžiaus, lyties, išsilavinimo ir socialinės padėties atžvilgiu.

**7 lentelė. Pacientų ir kontrolinės grupės asmenų, kuriems diagnozuota veido srities HSV infekcija, sociodemografiniai duomenys**

	Pacientai, kuriems diagnozuota veido srities HSV infekcija	Kontrolinės grupės asmenys	p reikšmė
<b>Iš viso:</b>	n=35	n=50	
<b>Lytis:</b> 1. Vyras 2. Moteris	12 (34 %) 23 (66 %)	15 (30 %) 35 (70 %)	0,813 <sup>1</sup>
<b>Amžius:</b> 1. Vidurkis, m. 2. Ribos, m.	39,1±15,7 19-75	39,4±10,3 20-58	0,931 <sup>2</sup>
<b>Išsilavinimas:</b> 1. Aukštasis 2. Aukštesnysis 3. Vidurinis	21 (60 %) 4 (11,4 %) 10 (28,6 %)	22 (44 %) 16 (32 %) 12 (24 %)	0,087 <sup>1</sup>
<b>Šeimyninė padėtis:</b> 1. Nevedęs/netekėjusi 2. Vedęs ar sambūvyje 3. Našlys ar išsiskyres/usi	14 (40 %) 16 (45,7 %) 5 (14,3 %)	9 (18 %) 34 (68 %) 7 (14 %)	0,077 <sup>1</sup>
<b>Socialinė padėtis:</b> 1. Dirbantis 2. Bedarbis 3. Studentas 4. Pensininkas	27 (77,1 %) 4 (11,4 %) 1 (2,9 %) 3 (8,6 %)	45 (90 %) 2 (4 %) 2 (4 %) 1 (2 %)	0,057 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fisherio tikslusis testas, <sup>2</sup> t-testas

**Serologija.** Dauguma tiriamosios ir kontrolinės grupės asmenų buvo HSV-1 IgG seropozityvūs (97,1% palyginti su 90%). Antikūnai prieš abiejų tipų HSV buvo rasti 1 pacientui ir 7 kontrolinės grupės asmenų kraujyje (8 lentelė).

**8 lentelė. Pacientų su HSV genitaline infekcija ir kontrolinių asmenų tipo specifinė serologija**

	Pacientai, kuriems diagnozuota veido srities HSV infekcija	Kontrolinės grupės asmenys	p reikšmė <sup>1</sup>
<b>Iš viso:</b>	n=35	n=50	
<b>Anti-HSV-1 IgG serologinis tyrimas:</b> Teigiamas Neigiamas	34 (97,1 %) 1 (2,9 %)	45 (90 %) 5 (10 %)	0,393
<b>Anti-HSV-2 IgG serologinis tyrimas:</b> Teigiamas Neigiamas	1 (2,9 %) 34 (97,1 %)	7 (14 %) 43 (86 %)	0,133

<sup>1</sup> Fisherio tikslusis testas

**Veido srities HSV infekcijos klinika, HSV DNR nustatymas bėrimuose ir serologija.** Daugiau kaip pusė pacientų (68,8%), kurių veido bėrimuose buvo rastas *herpes simplex* virusas, mėginių paėmimo metu turėjo matomas pūsleles ar opeles. Visi pacientai, išskyrus vieną, kurio PGR buvo teigiama, nurodė infekcijos recidyvą. Kadangi pastarojo paciento kraujyje rasta anti-HSV-1 IgG antikūnų, esamas ligos epizodas buvo traktuotas kaip pirmas veido srities HSV infekcijos simptominis pasireiškimas.

Simptomų trukmė svyravo nuo 1 iki 5 dienų. Trisdešimt vienas (96,9%) pacientas nurodė, kad lūpų pūslelinės bėrimų trukmė buvo trumpesnė negu 5 dienos. Tuo tarpu pacientų, kurių PGR buvo neigiama, grupėje bėrimai truko ilgiau negu 5 dienos ir nebuvo matomų pūslelių/opelių, o tik šašeliai (9 lentelė). *Herpes simplex* viruso kiekis veido srities bėrimuose recidyvo metu svyravo nuo 90 iki  $57 \times 10^6$  (mediana  $5,7 \times 10^5$ ) DNR kopijų per vieną PGR reakciją (vidurkis  $29 \times 10^5 \pm 1 \times 10^7$ ).

Dauguma pacientų turėjo anti-HSV-1 IgG antikūnų ir buvo HSV-2 seronegatyvūs. Vienas pacientas, kurio HSV-1 PGR buvo teigiama, turėjo antikūnų prieš abiejų tipų HSV (9 lentelė).

**9 lentelė. Pacientų, kuriems diagnozuota veido srities HSV infekcija, klinikiniai aspektai**

	Pacientai, kurių PGR teigiama	Pacientai, kurių PGR neigiama
<b>Iš viso:</b>	n=32	n=3
<b>Lytis: 1. Vyrai</b>	12 (37,5 %)	0 (0 %)
<b>2. Moterys</b>	20 (62,5 %)	3 (100 %)
<b>Amžius:</b>		
<b>1. Vidurkis, m.</b>	40,3±15,8	26,3±5,1
<b>2. Ribos, m.</b>	19-75	22-32
<b>1. Pirmas HSV infekcijos epizodas</b>	1 (3,1 %)	3 (100 %)
<b>2. Recidyvas</b>	31 (96,9 %)	0 (0 %)
<b>Pūslelės, opelės:</b>		
<b>1. Taip</b>	22 (68,8 %)	0 (0 %)
<b>2. Ne</b>	10 (31,3 %)	3 (100 %)
<b>Epizodo trukmė :</b>		
<b>1. &lt; 5 d.</b>	31 (96,9 %)	0 (0 %)
<b>2. ≥ 5 d.</b>	1 (3,1 %)	3 (100 %)
<b>HSV tipas</b>		
<b>HSV-1</b>	31 (96,9 %)	3 (100 %)
<b>HSV-2</b>	1 (3,1 %)	0 (0 %)
<b>Anti-HSV1 serologinis tyrimas:</b>		
<b>Teigiamas</b>	1 (3,1 %)	0 (0 %)
<b>Neigiamas</b>	31 (96,9 %)	3 (100 %)

<sup>1</sup>Fišerio tikslusis testas

**„Sausi“ mėginiai iš veido ir lytinių organų bėrimų.** Visi „sausieji“ (t.y. be buferinio tirpalo) mėginiai taip pat buvo ištirti atliekant kiekybinę realaus laiko PGR, nepaisant to, kad šie mėginiai buvo laikyti atsarginiais. „Sausų“ ir „su buferiniu tirpalu“ PGR rezultatai koreliavo tarpusavyje, išskyrus vieną mėginį. Šis buvo paimtas iš lytinių

organų bėrimų: mėginyje su buferiniu tirpalu rastas HSV-1, tuo tarpu „sausas“ mėginys buvo PGR neigiamas. Taip galėjo nutikti dėl mažo HSV-1 DNR kopijų skaičiaus genitalijų bėrimuose.

### 3.2. Eksperimentinė tyrimo dalis

Šiame tyrime buvo sekvenuotos HSV1-1 ir HSV-2 LAT promotoriaus sritys. Kartu buvo ištirtas ir HSV-1 LAT regionas, apimantis UOL (angl. „*upstream of LAT*“) geną. UOL genas yra nurašomas ta pačia kryptimi kaip ir LAT genas bei, kaip manoma, koduoja 96 amino rūgščių baltymą (Naito ir kt., 2005).

#### 3.2.1. Metodologiniai tyrimo ypatumai

Iš viso HSV LAT promotoriaus analizei surinkti 146 mėginiai, tačiau viename veido sritys mėginyje rastos HSV-1 DNR nepavyko amplifikuoti dėl mažo DNR kopijų skaičiaus. Todėl LAT tyrime buvo ištirti 145 klinikiniai mėginiai: 74 HSV-1 (61 veido sritys, 1 CSS mėginys ir 12 lytinių organų mėginių) ir 71 HSV-2 (68 genitaliniai and 3 CSS mėginiai).

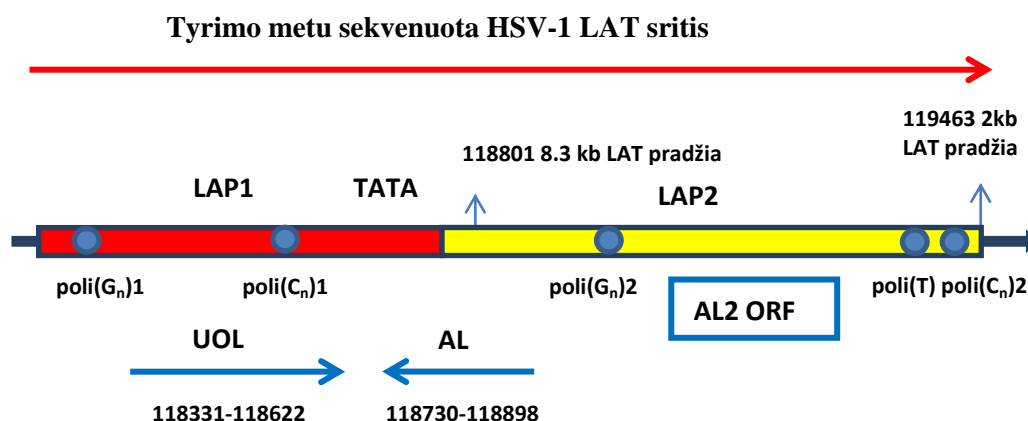
HSV LAT promotoriaus analizei buvo sukurtas naujas PGR metodas, specifiškas atskirai HSV-1 ir HSV-2 (žr. tyrimo metodus). Tyrimo metu buvo amplifikuotas 1360 bp HSV-1 ir 1141 bp HSV-2 LAT regionas, apimantis LAT promotorių. Kadangi LAT promotoriaus sritis yra gausi G+C (69% G+C HSV-1 ir 77% G+C HSV2) ir dėl to susiformuoja antrinė DNR struktūra, promotoriaus amplifikacija standartinėmis PGR sąlygomis nebuvo sėkminga. Todėl tyrime taikytas karšto starto „*touchdown*“ PGR metodas (Bachmann ir kt., 2003), naudojant *Master mix* su „Q“ tirpalu (QIAGEN). Esant mažam HSV DNA kopijų skaičiui mėginiuose, taikytas lizdinės PGR metodas tokiomis pačiomis sąlygomis. Reakcijos sąlygos optimizuotos po daugelio eksperimentų. Norint išvengti antrinių DNR struktūrų susidarymo sekvenavimo metu, į sekvenavimo reakcijos mišinį buvo pridėta 1M betaino (Sigma Aldrich). Šiame tyrime betainas sumažina antrinių DNR struktūrų formavimąsi, kaip pastebėta Haqqi ir kt. (Haqqi ir kt., 2002).

Kieleczawa (Kieleczawa, 2006) pastebėjo, kad labai sunku sekvenuoti mononukleotidų, sudarytų iš pasikartojančio to paties nukleotido, sritis, t.y. homopolimerinių nukleotidų sritis (HNS). Todėl PGR amplikonai su ilgais HNR buvo klonuoti į TOPO ląsteles. Iš kiekvieno klonuoto mėginio buvo gauta nuo 3 iki 5 klonų.

HSV-1 LAT promotoriaus sekos buvo palygintos su referentine HSV-1 17 paderme, HSV-2 – su referentine HG52 paderme. Šiame tyrime buvo nagrinėta DNR sekų įvairovė LAT promotoriaus homopolimerinių nukleotidų srityse.

#### 3.2.2. HSV-1 homopolimerinių nukleotidų sritys

Sekvenavus promotoriaus sritį ir atlikus daugybinių sekų palyginimą, HSV-1 LAT regione radome penkias HNS sritis: dvi poli(C) (**poli(C)<sub>n</sub>1** ir **poli(C)<sub>n</sub>2**), vieną poli(T) (**poly(T)**) ir dvi poli(G) (**poli(G)<sub>n</sub>1** ir **poli(G)<sub>n</sub>2**) (4 pav.). Šiame tyrime buvo nagrinėtos HNS sritys, sudarytos iš 7 ir daugiau mononukleotidų.



**4 pav.** HSV-1 LAT promotoriaus (LAP1 and LAP2) regiono variabilių homopolimerinių nukleotidų sričių (**poli(G<sub>n</sub>)1** ir **poli(G<sub>n</sub>)2**, **poli(C<sub>n</sub>)1** ir **poli(C<sub>n</sub>)2** ir **poli(T)**) schema

**Recidyvų dažnis.** Duomenys apie HSV infekcijos recidyvų dažnį surinkti iš Lietuvos pacientų. Iš 37 HSV-1 mėginių, 32 buvo paimti recidyvuojančios infekcijos, 5 - pirmojo HSV epizodo metu. Recidyvų dažnis svyravo nuo <1 iki 10 recidyvų/metus. Recidyvų dažnis per metus išskirtas į 3 kategorijas: labai retai (≤1-2), retai (3-5) ir dažnai (≥6).

**Pol(G<sub>n</sub>)1.** Daugumoje HSV-1 mėginių (63/75 84%) nukleotidų pozicijose 118297-118304 (pozicija 224 HSV-1 sekų palyginime) (12-13 pav.) rastos „negrynos“ kartotinės mononukleotidų sekos „GGGGGAGG“ (kaip ir referentinėje HSV-1 17 padermėje). Tačiau dėl deoksiadenozino delecijos dvylikoje mėginių rasti 6 poli(G<sub>n</sub>) sekų variantai, svyruojantys nuo 7 iki 12 „G“ nukleotidų (10 lentelė).

**10 lentelė.** HSV-1 LAT promotoriaus **poli(G<sub>n</sub>)1** srities charakteristika

HSV-1 poly(G <sub>n</sub> )1 sekų variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
<b>GGGGGAGG</b>	34	29	63
<b>G<sub>7</sub></b>	1	1	2
<b>G<sub>8</sub></b>	0	3	3
<b>G<sub>9</sub></b>	1	2	3
<b>G<sub>10</sub></b>	0	1	1
<b>G<sub>12</sub></b>	1	2	3

**Recidyvų dažnis ir poli(G<sub>n</sub>)1 sritis.** Ištyrus mėginius, paimtus recidyvo metu, buvo rasti 3 poli(G) variantai, tarp kurių dominavo GGGGGAGG. Pastarasis variantas buvo tolygiai pasiskirstęs tarp „labai retų“ ir „retų“ recidyvų kategorijų, 6 GGGGGAGG mėginiai pateko į 6 ir daugiau recidyvų per metus grupę. G<sub>9</sub> ir G<sub>12</sub> pateko į „labai retų“ recidyvų kategoriją (11 lentelė).

**11 lentelė. HSV-1 poli(G<sub>n</sub>)1 srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis**

HSV-1 poly(G <sub>n</sub> )1 sekų variantai	Recidyvai per metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
GGGGGAGG	12	12	6	30
G <sub>9</sub>	1	0	0	1
G <sub>12</sub>	1	0	0	1
<b>Iš viso</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>32</b>

**Poli(C<sub>n</sub>)1.** „C“ nukleotidų skaičius šiame regione (HSV-1 17 referentinės padermės C<sub>10</sub> srities nukleotidų pozicija 118568-118577; 404 pozicija HSV-1 sekų palyginime (12-13 pav.)) svyravo nuo 7 iki 15, sudarydami 8 sekų variantus. Ši mononukleotidų sritis iš dalies sutampa su UOL genu. Didžioji dauguma poli(C) sekų (57/75 76%) buvo sudarytos iš 7-10 „C“ nukleotidų. Tarp Švedijos mėginių vyravo C<sub>7</sub> variantas, tarp Lietuvos - C<sub>9</sub> (12 lentelė). Variacijos šio regiono srityje (pailgėjimas ar sutrumpėjimas) galėtų turėti įtakos UOL geno baltymų sintezei.

**12 lentelė. HSV-1 LAT promotoriaus poli(C<sub>n</sub>)1 srities charakteristika**

HSV-1 poly(C <sub>n</sub> )1 sekų variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
C <sub>7</sub>	3	11	14
C <sub>8</sub>	6	8	14
C <sub>9</sub>	13	3	16
C <sub>10</sub>	6	7	13
C <sub>11</sub>	1	6	7
C <sub>12</sub>	4	1	5
C <sub>14</sub>	4	0	4
C <sub>15</sub>	0	1	1

**Recidyvų dažnis ir poli(C<sub>n</sub>)1 sritis.** Kaip jau minėta, C<sub>9</sub> variantas tarp vyravo lietuviškų sekų ir nebuvo rasta reikšmingo skirtumo tarp recidyvų dažnio kategorijų (13 lentelė).

**13 lentelė. HSV-1 poli(C<sub>n</sub>)1 srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis**

HSV-1 poli(C <sub>n</sub> )1 sekų variantai	Recidyvai/metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
C <sub>7</sub>	2	0	1	3
C <sub>8</sub>	1	4	0	5
C <sub>9</sub>	5	3	4	12
C <sub>10</sub>	3	1	0	4
C <sub>11</sub>	0	1	0	1
C <sub>12</sub>	1	2	0	3
C <sub>14</sub>	3	0	1	4
<b>Iš viso</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>32</b>

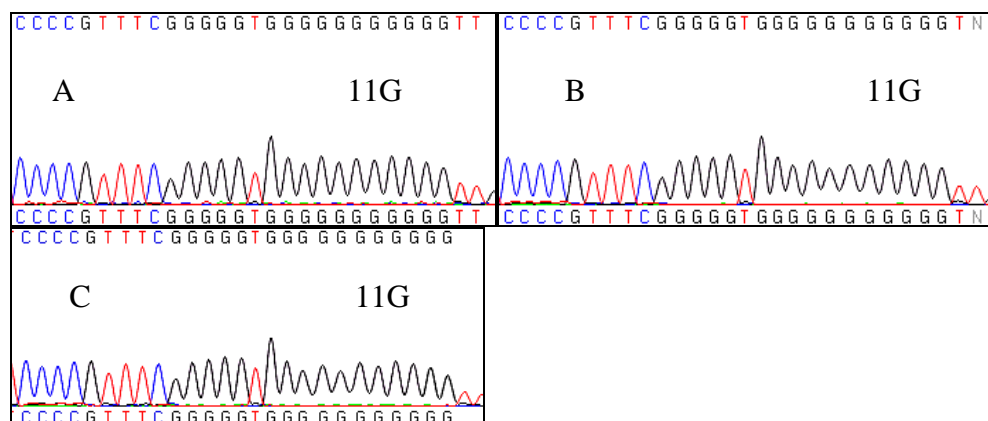


**Poli(G<sub>n</sub>)2.** Šią sritį referentinėje HSV-1 17 padermėje sudarė „negryna“ „G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>“ seka (nukleotidų pozicija 118953-189660; 915 pozicija HSV-1 sekų palyginime (12-13 pav.), esanti tarp AL ir AL2. Keli mėginiai dėl ilgos poli(G) grandinės (iki 12 nukleotidų) buvo klonuoti, norint gauti įskaitomas DNR sekas. Seka „G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>“ pasitaikė dažniau tarp mėginių iš Lietuvos (28/37 75,7%), palyginti su mėginiais iš Švedijos (13/38 34,2%). Tarp 37 sekų iš Lietuvos nustatėme 6 šios srities variantus, tarp 38 iš Švedijos – 8 (14 lentelė).

**14 lentelė.** HSV-1 LAT promotoriaus poli(G<sub>n</sub>)2 srities charakteristika

HSV-1 poli(G <sub>n</sub> )2 sekų variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub></b>	28	13	41
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>11</sub></b>	0	1	1
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>10</sub></b>	1	1	2
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>9</sub></b>	0	2	2
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>8</sub></b>	3	9	12
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>7</sub></b>	0	4	4
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>6</sub></b>	3	7	10
<b>G<sub>5</sub>TG<sub>5</sub></b>	1	1	2
<b>G<sub>12</sub></b>	1	0	1

Visuose švedų genitaliniuose HSV mėginiuose rastas G<sub>5</sub>TG<sub>n</sub> genotipas, tuo tarpu genitalinės srities mėginių iš Lietuvos HSV LAT promotoriuje rastos G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub> (4 iš 6) ir G<sub>5</sub>TG<sub>n</sub> sekos. Keli mėginiai buvo klonuoti: visi to paties paciento klonai, gauti iš to paties paciento, turėjo tą patį „G“ nukleotidų skaičių (5 pav.).



**5 pav.** HSV-1 poli(G<sub>n</sub>)2 srities sekvenavimo chromatogramos. Visuose to paties paciento klonuose (A-C) rastas tas pats G<sub>5</sub>TG<sub>11</sub> variantas

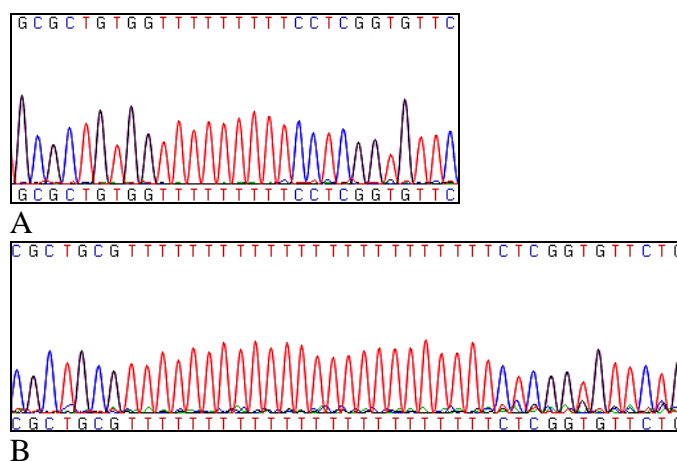
**Recidyvų dažnis ir poli(G<sub>n</sub>)2 sritis.** HSV-1 seka G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub> vyraavo visose trijose recidyvų dažnio kategorijose (15 lentelė).

15 lentelė. HSV-1 poli(G<sub>n</sub>)<sub>2</sub> srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis

HSV-1 poli(G <sub>n</sub> ) <sub>2</sub> sekų variantai	Recidyvai per metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
G <sub>5</sub> TG <sub>2</sub> TG <sub>5</sub>	8	13	3	24
G <sub>5</sub> TG <sub>10</sub>	0	0	1	1
G <sub>5</sub> TG <sub>8</sub>	2	0	1	3
G <sub>5</sub> TG <sub>6</sub>	1	1	0	2
G <sub>5</sub> TG <sub>5</sub>	0	0	1	1
G <sub>12</sub>	1	0	0	1
<b>Iš viso</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>32</b>

**Poli(T<sub>n</sub>)** ir **poli(C<sub>n</sub>)<sub>2</sub>** sritis vieną nuo kitos skiria 46 nukleotidai LAP2 promotoriuje. Dėl ilgų homopolimerinių nukleotidų sričių 18 mėginių iš Lietuvos ir 20 iš Švedijos buvo klonuoti.

**Poli(T<sub>n</sub>)** srityje „T“ skaičius svyravo nuo 9 iki 30 nukleotidų (119301-119309 nukleotidų pozicija referentinėje HSV-1 17 padermėje, 1271 pozicija HSV-1 sekų palyginime, (12-13 pav.)). Skirtinguose klonuose iš skirtingų mėginių buvo rastas variabilus „T“ skaičius. „T“ nukleotidų skaičius buvo skirtingas netgi to paties paciento klonuose (t.y. klonuose, gautuose iš to paties mėginio). Nepaisant minėto variabilumo, remiantis nukleotidų skaičiaus vidurkiu (duomenys neparodyti), sekas galima suskirstyti į 2 grupes: ilgąsias poli(T) sekas (mononukleotidų skaičius ≥ 16 nt, t.y., 16-30 nt) ir trumpąsias (9-13 nt). Dvidešimt septyniuose mėginiuose rastos ilgosios poli(T) sekos, 48 – trumposios. Trumposios sekos vyravo tarp mėginių iš Švedijos (81,2%), tuo tarpu sekos iš Lietuvos daugiausia buvo ilgos. (6 pav., 16 lentelė).



6 pav. HSV-1 poli(T<sub>n</sub>) regiono sekvenavimo chromatogramos:

A – trumposios poli(T) sekos

B – ilgosios poli(T) sekos

16 lentelė. HSV-1 LAT promotoriaus poli(T) srities charakteristika

HSV-1 poli(T) sekų variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
<b>Ilgosios poli(T) (16-30 nt) sekos</b>	21 (56,8%)	6 (18,8%)	27 (36%)
<b>Trumposios poli(T) (9-13 nt) sekos</b>	16 (43,2%)	32 (81,2%)	48 (64%)

Kiekvienas variantas atspindi įvairių poli(T) sekų ilgį skirtinguose klonuose, gautuose tiek iš skirtingų pacientų, tiek iš to paties paciento, tačiau kiekvienos ilgio kategorijos vidurkiai reikšmingai skirtingi.

**Recidyvų dažnis ir poli(T) sritis.** Iš 32 pacientų su atsikartojančia HSV infekcija 18-oje mėginių rastos ilgosios poli(T) sekos, 14 mėginių – trumposios sekos. Nebuvo reikšmingo skirtumo tarp recidyvų dažnio ir poli(T) ilgio (17 lentelė).

17 lentelė. HSV-1 poli(T) srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis

HSV-1 poli(T) sekų variantai	Recidyvai per metus			Iš viso
	≤1-2	4-5	≥6	
<b>Ilgosios poli(T) (16-30 nt) sekos</b>	7	8	3	18
<b>Trumposios poli(T) (9-13 nt) sekos</b>	5	6	3	14

**Poli(C<sub>n</sub>)<sub>2</sub>.** Šis HNS „C“ regionas yra 46 nukleotidų atstumu nuo poli(T) srities (HSV-1 17 padermės 119356-119365 nukleotidų pozicijos; 1345 pozicija HSV-1 sekų palyginime (12-13 pav.)). „C“ nukleotidų skaičius varijavo nuo 7 iki 13, mėginiuose vyravo 9-11 „C“ (18 lentelė).

**Recidyvų dažnis ir poli(C<sub>n</sub>)<sub>2</sub> sritis.** Ilgiausios poli(C<sub>14-15</sub>) grandinės buvo rastos keturių pacientų, kuriems buvo labai reti recidyvai (≤1 recidyvas per metus) mėginiuose. C<sub>9</sub> - C<sub>12</sub> vyravo mėginiuose tiek iš Lietuvos, tiek iš Švedijos (19 lentelė).

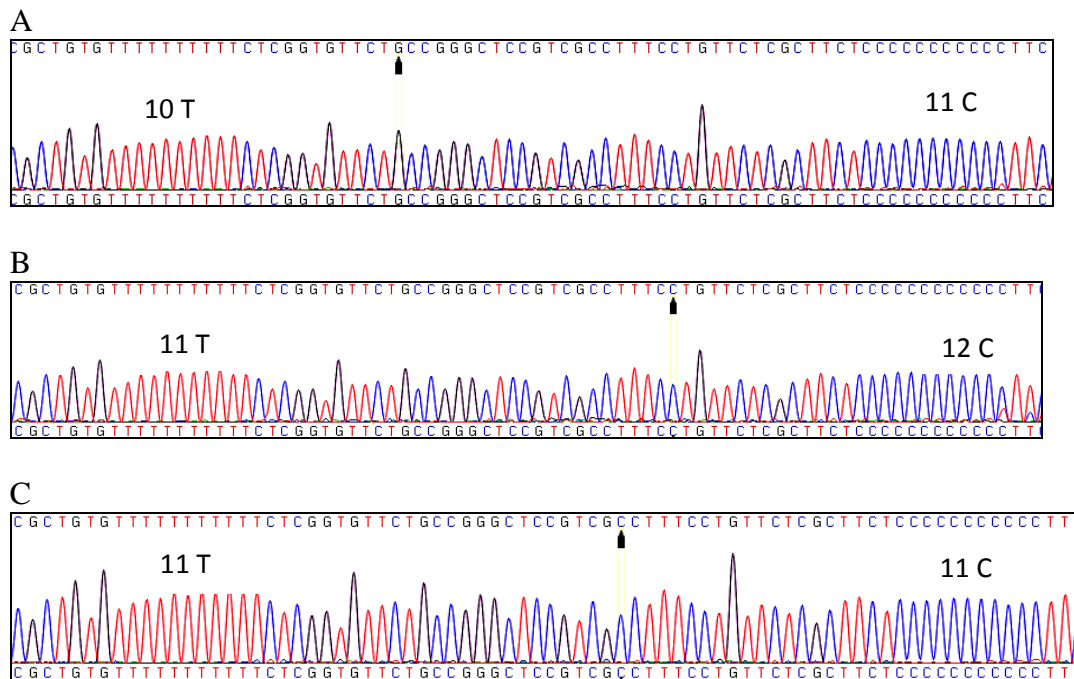
**18 lentelė.** HSV-1 LAT promotoriaus **poli(C<sub>n</sub>)2** srities charakteristika

HSV-1 poli(C <sub>n</sub> )2 sekų variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
C <sub>7</sub>	1	0	1
C <sub>8</sub>	0	2	2
C <sub>9</sub>	19	18	31
C <sub>10</sub>	20	22	39
C <sub>11</sub>	18	23	41
C <sub>12</sub>	11	9	19
C <sub>13</sub>	3	0	3
C <sub>14</sub>	3	3	6
C <sub>15</sub>	1	0	1

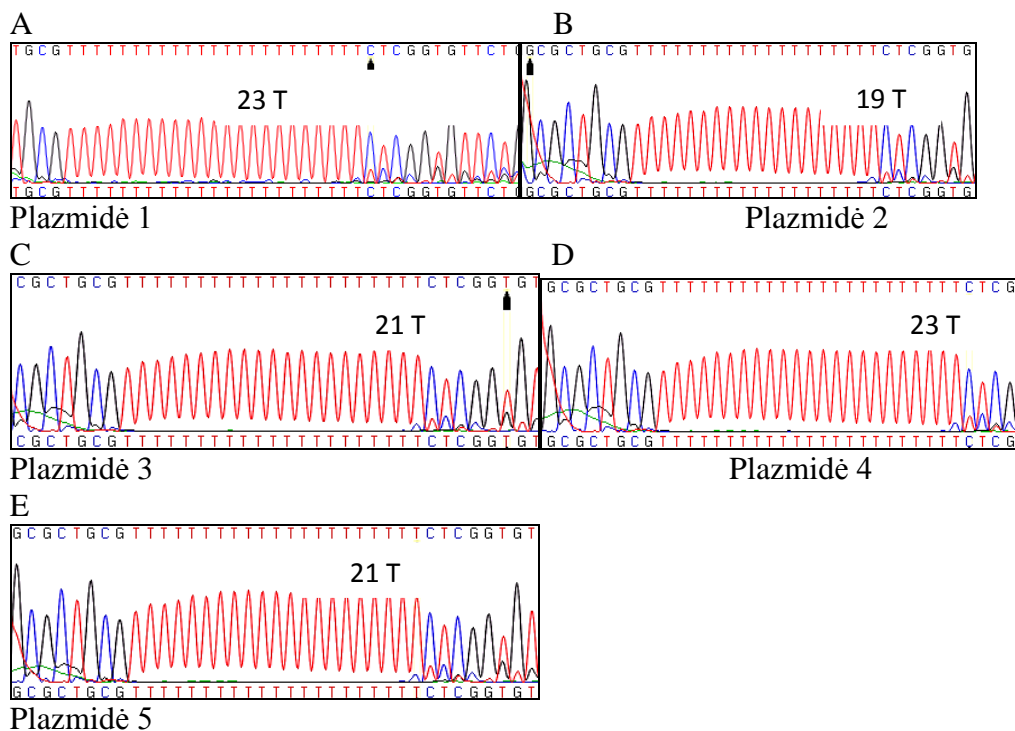
**19 lentelė.** HSV-1 **poli(C<sub>n</sub>)2** srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis

HSV-1 poli(C <sub>n</sub> )2 sekų variantai	Recidyvai/metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
C <sub>7</sub>	1	0	0	1
C <sub>9</sub>	4	7	2	13
C <sub>10</sub>	6	5	6	17
C <sub>11</sub>	9	4	5	18
C <sub>12</sub>	4	4	2	10
C <sub>13</sub>	1	2	0	3
C <sub>14</sub>	3	0	0	3
C <sub>15</sub>	1	0	0	1
<b>Iš viso</b>	<b>29</b>	<b>22</b>	<b>15</b>	<b>66</b>

Kitaip negu **poli(G<sub>n</sub>)2** regione, **poli(T<sub>n</sub>)** ir **poli(C<sub>n</sub>)2** srityse buvo rastas įvairus „T“ ir „C“ nukleotidų skaičius skirtinguose klonuose: tiek klonuose, gautuose iš kelių mėginių (t.y. iš skirtingų pacientų), tiek klonuose, gautuose iš to paties mėginio (t.y. iš to paties paciento) (7-8 pav.). Taigi šiuose regionuose matomas variabilumas tiek tarp viruso padermių, tiek pačių padermių viduje (žr. žemiau).



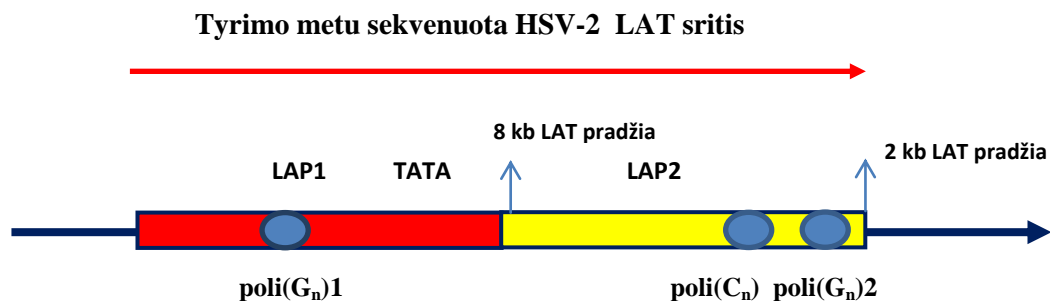
**7 pav.** To paties paciento **poli(T<sub>n</sub>)** ir **poli(C<sub>n</sub>)<sup>2</sup>** sričių skirtingų klonų (A-C) sekvenavimo chromatogramos rodo skirtingą „T“ ir „C“ nukleotidų skaičių



**8 pav.** To paties paciento ilgosios **poli(T<sub>n</sub>)** srities 5 skirtingų klonų (A-E) sekvenavimo chromatogramos rodo 3 „T“ nukleotidų skaičiaus variantus (T<sub>19</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>23</sub>)

### 3.2.3. HSV-2 homopolimerinių nukleotidų sritys

HSV-2 žymiai mažiau ištirtas, palyginti su HSV-1. HSV-2 LAT promotoriaus regione rastos trys variabilios HNS sritys: **poli(G<sub>n</sub>)1**, **poli(C<sub>n</sub>)** ir **poli(G<sub>n</sub>)2** (9 pav.).



**9 pav.** HSV-2 LAT promotoriaus (LAP1 and LAP2) regiono variabilių homopolimerinių nukleotidų sričių (**poli(G<sub>n</sub>)1**, **poli(G<sub>n</sub>)2**, **poli(C<sub>n</sub>)**) schema

**Recidyvų dažnis.** Kaip ir HSV-1 infekcijos atveju, duomenys apie HSV-2 infekcijos recidyvų dažnį žinomi Lietuvos pacientų grupėje. Dvidešimt penki iš 34 Lietuvos pacientų, kuriems nustatyta HSV-2 genitalinė infekcija, nurodė ligos atsikartojimą, 9 - HSV-2 pirmąjį infekcijos epizodą. Recidyvų dažnis svyravo nuo <1 iki 15 recidyvų per metus. Kaip ir HSV-1 atveju, recidyvų dažnis per metus suskirstytas į 3 kategorijas: labai retai ( $\leq 1-2$ ), retai (3-5) ir dažnai ( $\geq 6$ ).

**Pol(G<sub>n</sub>)1 sritis:** nukleotidų pozicijos 119340-119350 HSV-2 referentinėje sekoje HG52; 237 pozicija HSV-2 sekų palyginimo schemoje (14 pav.). Šiame regione rasti trys sekų variantai: „CCCGCGTGCCG“, „CCCGCGGGCCG“ ir „TTG<sub>n</sub>“. Seka „CCCGCGTGCCG“ buvo dominuojanti ir beveik tolygiai pasiskirsčiusi tarp mėginių iš Lietuvos ir Švedijos. Poli(G) sekose rasti 4 variantai nuo 9 iki 12 „G“ nukleotidų, G<sub>9</sub> ir G<sub>10</sub> variantai pasitaikė dažniausiai (20 lentelė).

**20 lentelė.** HSV-2 LAT promotoriaus **poli(G<sub>n</sub>)1** srities charakteristika

HSV-2 sekų poli(G <sub>n</sub> )1 variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
CCCGCGTGCCG	26	27	53
CCCGCGGGCCG	0	1	1
TTG <sub>9</sub>	4	1	5
TTG <sub>10</sub>	2	4	6
TTG <sub>11</sub>	1	1	2
TTG <sub>12</sub>	1	3	4

**Recidyvų dažnis ir poli(G<sub>n</sub>)1sritis.** Dauguma pacientų su CCCGCGTGCCG seka nurodė iki 6 genitalinės HSV infekcijos recidyvų per metus. TTG<sub>9-11</sub> sekų nebuvo labai retų recidyvų grupėje (21 lentelė).

**21 lentelė. HSV-2 poli(G<sub>n</sub>)1 srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis**

HSV-2 sekų poli(G <sub>n</sub> )1 variantai	Recidyvai/metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
CCCGCGTGCCG	10	4	7	21
TTG <sub>9</sub>	0	1	1	2
TTG <sub>10</sub>	0	1	0	1
TTG <sub>11</sub>	0	0	1	1
<b>Iš viso</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>25</b>

**Poli(C<sub>n</sub>)** ir greta esantis **poli(G<sub>n</sub>)2** HNS regionai (panašiai kaip **poli(T<sub>n</sub>)** ir **poli(C<sub>n</sub>)2** sritis 1 tipo *herpes simplex* viruse) yra nutolę vienas nuo kito 75 nukleotidų atstumu. Septyni mėginiai iš Lietuvos ir 13 mėginių iš Švedijos buvo klonuoti.

**Poli(C<sub>n</sub>)** sritis: nukleotidų pozicijos 120065-120079 HSV-2 referentinėje sekoje HG52; 962 pozicija HSV-2 sekų sugretinimo scheme (14 pav.). „C“ nukleotidų skaičius svyravo nuo 9 iki 14. Tarp mėginių iš Lietuvos vyravo 12 „C“ variantas, tarp Švedijos – 13 „C“ (22 lentelė).

**22 lentelė. HSV-2 LAT promotoriaus poli(C<sub>n</sub>) srities charakteristika**

HSV-2 sekų poli(C <sub>n</sub> ) variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
C <sub>9</sub>	0	2	2
C <sub>10</sub>	2	4	6
C <sub>11</sub>	8	19	27
C <sub>12</sub>	20	21	41
C <sub>13</sub>	14	23	37
C <sub>14</sub>	0	4	4

**Recidyvų dažnis ir poli(C<sub>n</sub>) sritis.** Poli(C) sekų C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> variantai buvo tolygiai pasiskirstę visose trijose recidyvų dažnio kategorijose, išskyrus C<sub>10</sub>, kuris buvo rastas tik labai retų recidyvų (≤1-2/m.) grupėje. C<sub>14</sub> varianto nebuvo tarp mėginių iš Lietuvos (23 lentelė).

**23 lentelė. HSV-2 poli(C<sub>n</sub>) srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis**

HSV-2 sekų poli(C <sub>n</sub> ) variantai	Recidyvai/metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
C <sub>10</sub>	2	0	0	2
C <sub>11</sub>	2	2	2	6
C <sub>12</sub>	6	5	4	15
C <sub>13</sub>	3	2	2	14
<b>Iš viso</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>30</b>

**Poli(G<sub>n</sub>)2** sritis: nukleotidų pozicijos 120154-120166 HSV-2 referentinėje sekoje HG52; 1051 pozicija daugybinio HSV-2 sekų sugretinimo scheme (14 pav.).

„G“ nukleotidų skaičius svyravo nuo 8 iki 17. Tarp mėginių iš Lietuvos vyravo 9 „G“ variantas, tarp Švedijos – 12 „G“ (24 lentelė).

**24 lentelė.** HSV-2 LAT promotoriaus **poli(G<sub>n</sub>)2** srities pasikartojančių mononukleotidų sekų charakteristika

HSV-2 sekų poli(G <sub>n</sub> )2 variantai	Mėginiai iš Lietuvos	Mėginiai iš Švedijos	Iš viso
G <sub>8</sub>	3	4	7
G <sub>9</sub>	12	14	26
G <sub>10</sub>	7	15	22
G <sub>11</sub>	9	14	23
G <sub>12</sub>	9	16	25
G <sub>13</sub>	2	8	10
G <sub>14</sub>	0	2	2
G <sub>16</sub>	1	0	1
G <sub>17</sub>	1	0	1

**Recidyvų dažnis ir poli(G<sub>n</sub>)2 sritis.** G<sub>9</sub> variantas buvo beveik tolygiai pasiskirstęs visose trijose recidyvų dažnio kategorijose. Labai retų recidyvų kategorijoje dominavo G<sub>9</sub> variantas, retų - G<sub>10</sub>, dažnų recidyvų - G<sub>11</sub> variantas. Pacientui, kurio mėginyje rasto HSV-2 **poli(G<sub>n</sub>)2** sritį sudarė ilgiausia, sudaryta iš 17 „G“ nukleotidų HMS, HSV infekcija kartodavosi 2 kartus per metus (25 lentelė).

**25 lentelė.** HSV-2 **poli(G<sub>n</sub>)2** srities sekų įvairovė ir recidyvų dažnis

HSV-2 sekų poli(G <sub>n</sub> )2 variantai	Recidyvai/metus			Iš viso
	≤1-2	3-5	≥6	
G <sub>8</sub>	0	0	1	1
G <sub>9</sub>	2	5	2	9
G <sub>10</sub>	5	1	0	6
G <sub>11</sub>	4	2	3	9
G <sub>12</sub>	0	1	2	3
G <sub>16</sub>	1	0	0	1
G <sub>17</sub>	1	0	0	1
<b>Iš viso</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>30</b>

HSV-2, kaip ir HSV-1, **poli(C<sub>n</sub>)** ir **poli(G<sub>n</sub>)2** HNS regionuose skirtinguose klonuose radome variabilų „C“ ir „G“ nukleotidų skaičių. Taigi ir HSV-2 HNS regionuose nustatomas tiek intra-, tiek interindividualus variabilumas (žr. žemiau).



### 3.2.4. HSV LAT promotoriaus homopolimerinių nukleotidų sričių variabilumas tarp viruso padermių ir pačių padermių viduje

PGR pagausinimo produktų ir plazmidžių DNR sekoskaitos rezultatai rodo variabilų nukleotidų skaičių HSV-1 (**poli(T)** ir **poli(C<sub>n</sub>)2**) ir HSV-2 (**poli(C<sub>n</sub>)** ir **poli(G<sub>n</sub>)2**) homopolimerinių nukleotidų srityse. Šis variabilumas nustatomas tiek tarp viruso padermių, tiek pačių padermių viduje.

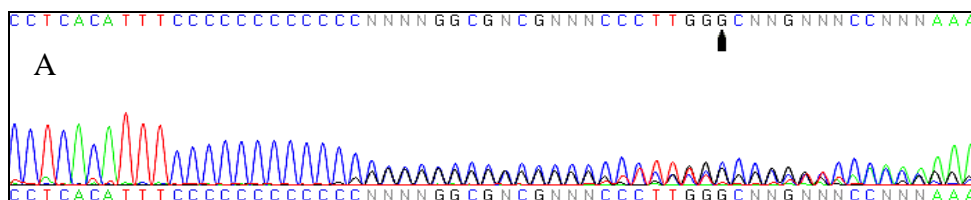
Daugumoje atvejų sekvenavimo chromatogramose DNR seka po HNS sričių (ypač ilgesnių HNS atveju) nebuvo įskaitoma. Norint įvertinti ir pašalinti PGR metu dėl *Tag* polimerazės slystelėjimo atsiradusias klaidas *in vitro*, 5 mėginiai (2 HSV-1 ir 3 HSV-2) buvo ištirti kelias būdais: 1) pagausinta genomine DNR buvo sekvenuota tiesiogiai, 2) plazmidė su klonuota DNR buvo sekvenuota tiesiogiai ir 3) plazmidės DNR prieš sekvenavimą buvo pagausinta PGR metu. Kaip jau minėta, daugumoje mėginių nustatėme variabilų nukleotidų skaičių homopolimerinių nukleotidų srityse skirtinguose to paties paciento HSV klonuose. Galima tai traktuoti kaip PGR klaidas dėl *Tag* polimerazės slystelėjimo PGR metu. Tačiau įdomu tai, kad tos pačios klonuotos DNR, sekvenavus ją tiesiogiai ir po amplifikacijos PGR, HNS mononukleotidų skaičius buvo toks pat (10-11 pav.). Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad mononukleotidų skaičiaus variacija homopolimerinių nukleotidų srityse atsiranda ne dėl PGR amplifikacijos artefaktų. Šie duomenys atitinka Rocha ir kt. aprašytus rezultatus (Rocha ir kt., 2002).

### 3.2.5. LAT promotoriaus sekų nukleotidų panašumo diagramos

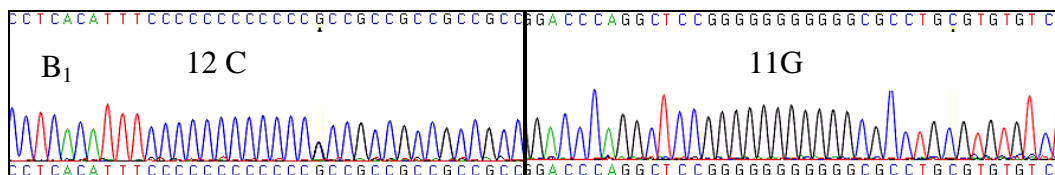
Norint grafiškai parodyti palygintų tarpusavyje nukleotidų panašumo laipsnį, buvo sukurtos panašumo diagramos (angl. *simplots*).

**HSV-1 LAT promotoriaus sekų panašumo diagramos** rodo, kad variabilų nukleotidų sričių promotoriuje nėra daug. Kai kurios variabilios sekos išsidėstę baltymus koduojančiose UOL, AL, AL2 srityse ir gali veikti šių baltymų amino rūgščių sekas. Viena iš baltymų AL koduojančių sekų iš dalies sutampa su LAT transkripcijos pradžia, esančia netoliese promotoriaus TATA sekų. Nepastebėta žymaus skirtumo tarp veido ir lytinių organų srities HSV-1 DNR variabilumo pobūdžio. Taip pat nėra HSV-1 LAT promotoriaus sekose reikšmingo skirtumo tarp Lietuvos ir Švedijos padermių bei tarp dažnų ir retų ligos recidyvų. Tai rodo, kad HSV-1 LAT promotoriaus sekų įvairovė neįtakoja patobiologinės viruso variacijos (12-13 pav.).

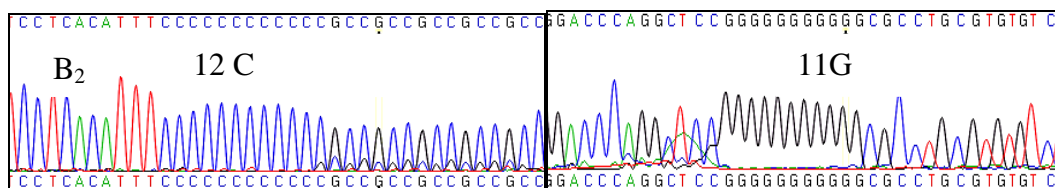
**HSV-2 LAT promotoriaus sekų panašumo diagramos.** Kaip ir HSV-1 atveju, HSV-2 sekų variacija nustatoma tik tam tikrose ribotose LAT promotoriaus srityse, kurių nėra daug. Kadangi dar nėra žinomų baltymų, kurie būtų koduojami HSV-2 LAT promotoriuje, todėl šių sekų variabilumo negalima vertinti baltymų atžvilgiu. HSV-2 atveju taip pat sekų variacija nepriklauso nuo geografinio HSV padermių pasiskirstymo ir recidyvų dažnio (14 pav.).



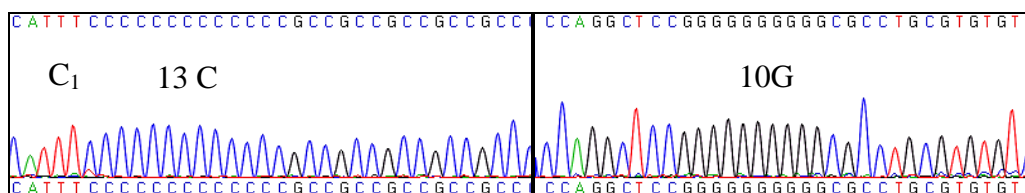
A. Tiesiogiai sekvenuoto HSV-2 DNR amplikono sekvenavimo chromatograma. Po homopolimerinės C nukleotidų srities DNR seka yra neįskaitoma



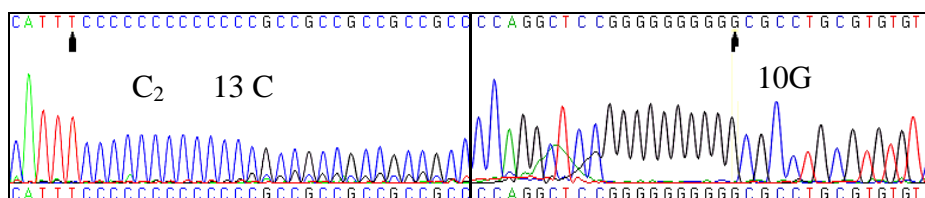
B<sub>1</sub>. Plazmidė 1. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota tiesiogiai



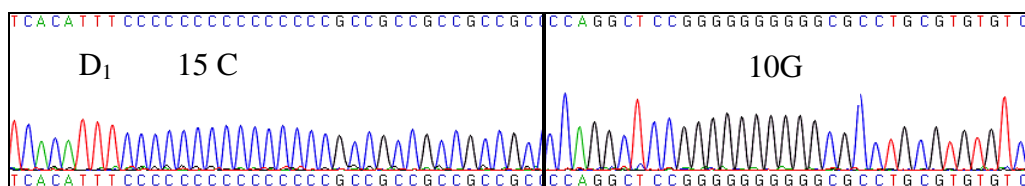
B<sub>2</sub>. Plazmidė 1. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota po pagausinimo PGR metu



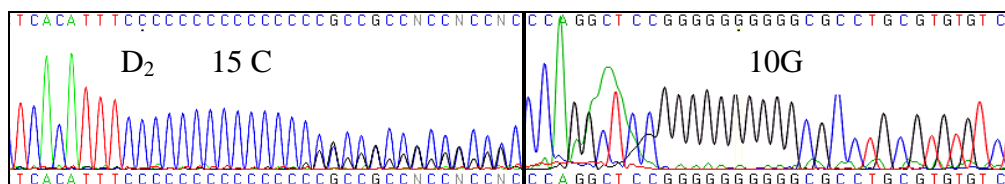
C<sub>1</sub>. Plazmidė 2. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota tiesiogiai



C<sub>2</sub>. Plazmidė 2. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota po pagausinimo PGR metu



D<sub>1</sub>. Plazmidė 3. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota tiesiogiai



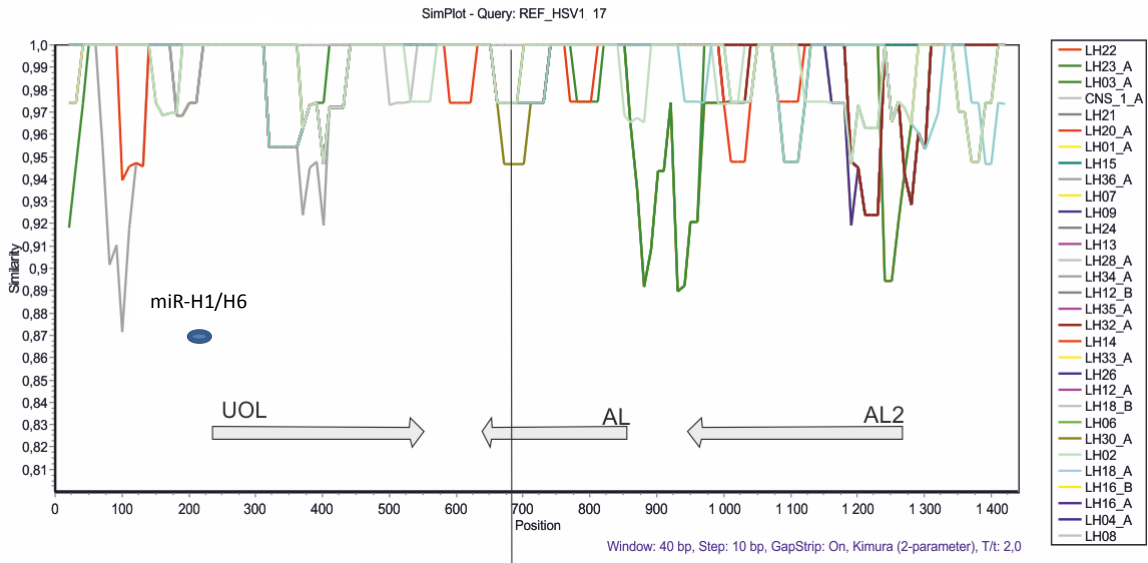
D<sub>2</sub>. Plazmidė 3. Sekvenavimas po klonavimo: plazmidės DNR sekvenuota po pagausinimo PGR metu

**10 pav.** To paties paciento HSV-2 poli(C<sub>n</sub>) ir poli(G<sub>n</sub>)<sub>2</sub> sričių sekvenavimo chromatogramos (A-D)

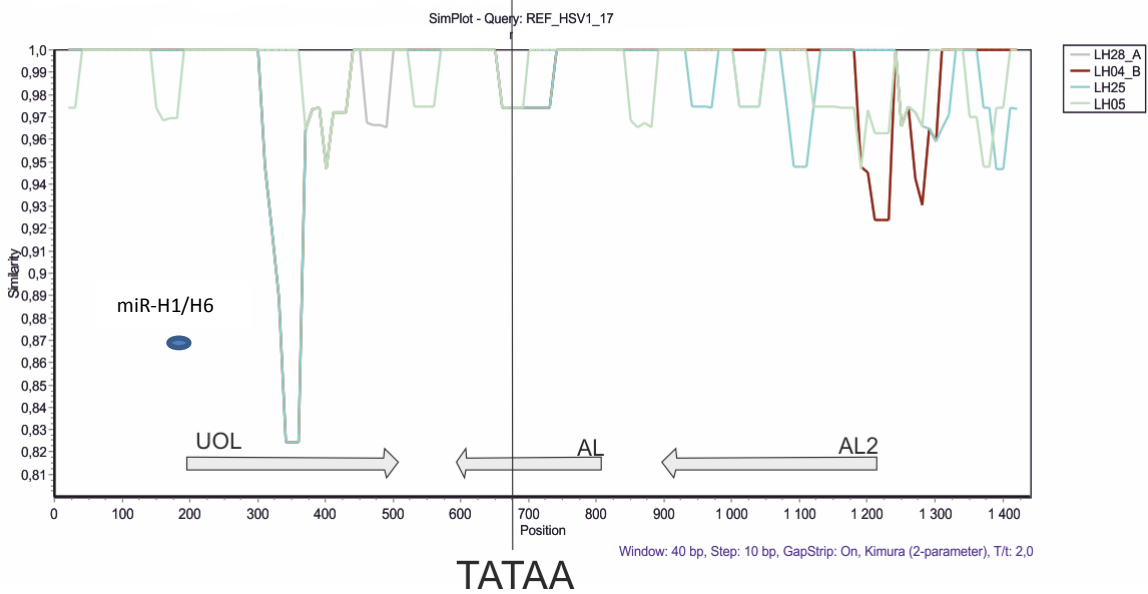


poly(Gn)1 poly(Cn)1 poly(Gn)2 poly(Cn)2 poly(Tn)

## Veido srities HSV-1, Vilnius, I dalis



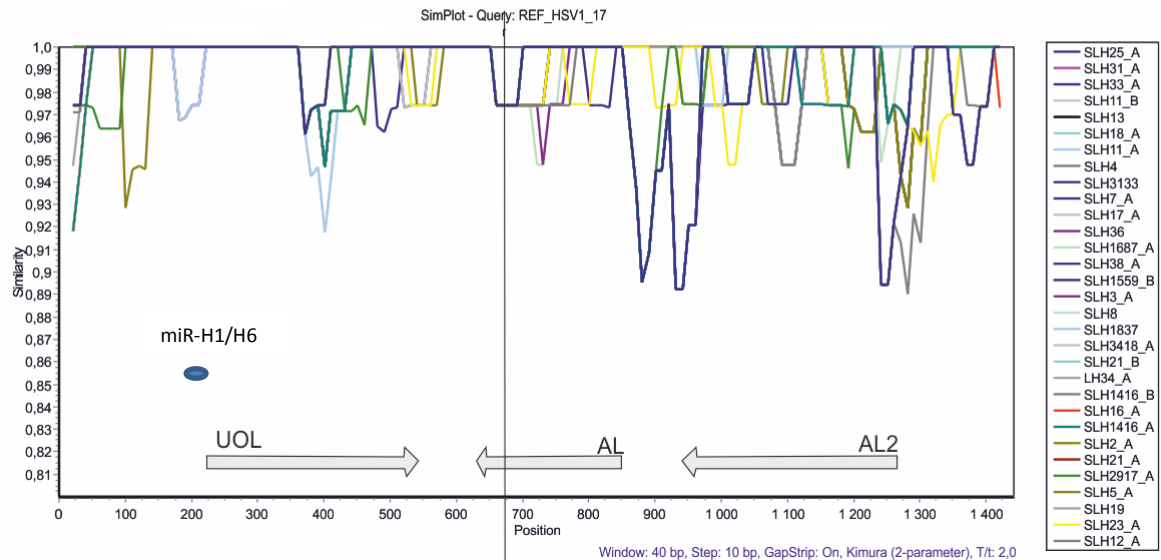
## Veido srities HSV-1, Vilnius, II dalis



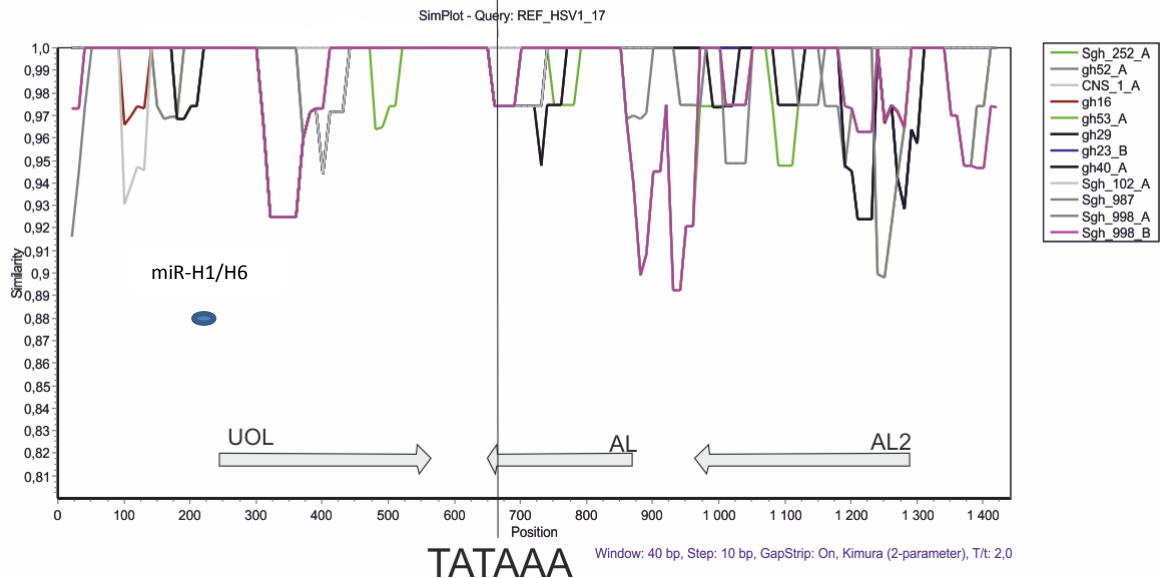
**12 pav.** HSV-1 LAT promotoriaus srities sekų panašumo diagramos (angl. *simplots*). Vilniaus pacientų veido srities bėrimuose rastos HSV padermės palygintos su 17 referentine paderme. Y ašyje nurodytas procentais išreikštas DNR sekų identiškumas. Diagramos viršuje nurodytos mononukleotidų sritys. Diagramoje pažymėti UOL, AL ir AL2 transkriptai, mikroRNR (miR-H1 ir miR-H6)

poly(Gn)1 poly(Cn)1 poly(Gn)2 poly(Cn)2 poly(Tn)

## Veido srities HSV-1, Upsala

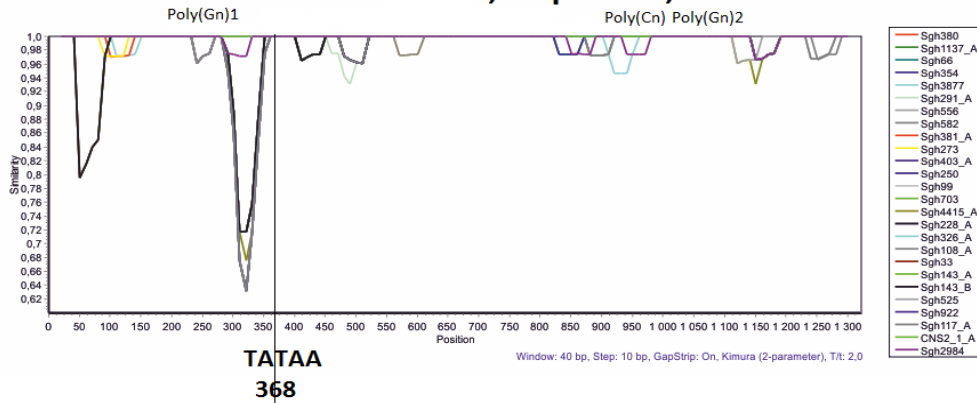


## Genitalinis HSV-1, Vilnius ir Upsala

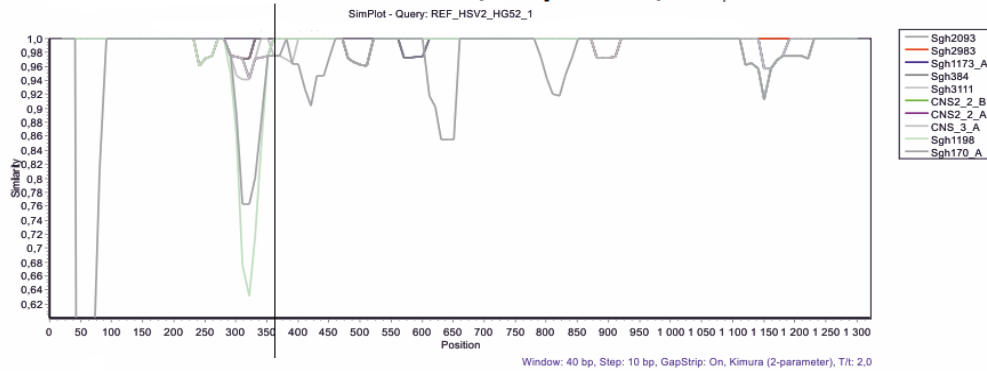


**13 pav.** HSV-1 LAT promotoriaus srities sekų panašumo diagramos (angl. *simplots*). Upsalos pacientų veido srities ir Vilniaus bei Upsalos lytinių organų srities bėrimuose rastos HSV padermės palygintos su 17 referentine paderme. Y ašyje nurodytas procentais išreikštas DNR sekų identiškumas. Diagramos viršuje nurodytos mononukleotidų sritys. Diagramoje pažymėti UOL, AL ir AL2 transkriptai, mikroRNR (miR-H1 ir miR-H6)

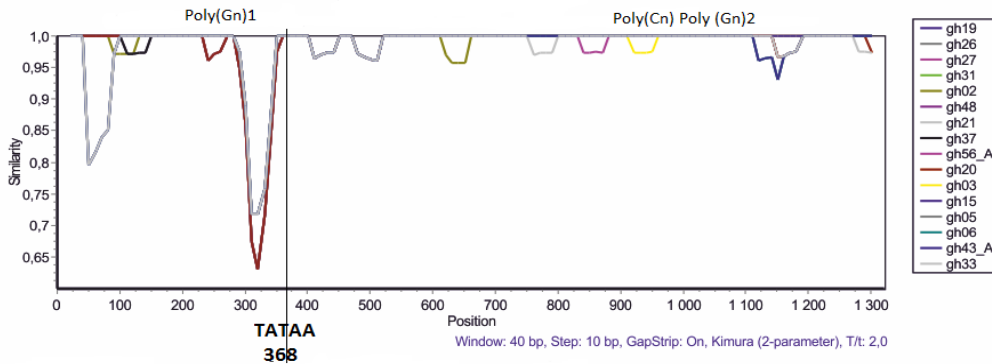
## Genitalinis HSV-2, Upsala, I dalis



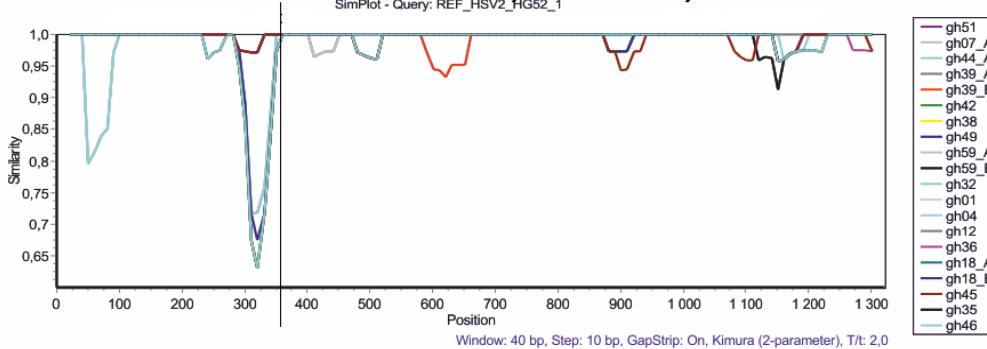
## Genitalinis HSV-2, Upsala, II dalis



## Genitalinis HSV-2, Vilnius, I dalis



## Genitalinis HSV-2, Vilnius, II dalis



**14 pav.** HSV-2 LAT promotoriaus srities sekų panašumo diagramos (angl. *simplots*). Vilniaus ir Upsalos lytinių organų srities bėrimuose rastos HSV padermės palygintos su HG52 referentine paderme. Y ašyje nurodytas procentais išreikštas DNR sekų identiškumas. Diagramos viršuje nurodytos mononukleotidų sritys.

### 3.2.6. Filogenetinė HSV LAT promotoriaus sekų analizė

Sekvenavus HSV-1 ir HSV-2 LAT promotoriaus sritį iš klinikinių mėginių, kitos HSV-1 padermės (17, F, H129, KOS, CJ311, CJ360, CJ394, CJ970, CR38, OD4, 134, E25, E03, E07, E08, E10, E11, E12, E13, E14, E19, E22, E23, E35, F06, R11, R62, S23, S25, TFT401) ir HSV-2 padermės (HG52, 333) buvo atrinktos iš NCBI internetinės duomenų bazės ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) filogenetinei analizei atlikti. Atlikus daugybinių sekų palyginimą, sukonstruoti DNR sekomis paremti filogeniniai medžiai, kaip aprašyta metoduose.

Tiek kladogramos (pateiktos disertacijos medžiagoje), tiek filogramos (15-16 pav.) rodo, kad HSV LAT promotoriaus srities sekų įvairovė turi geografinę priklausomybę: Rytų Afrikos HSV-1 padermės sudaro 2 klasterius, tuo tarpu Rytų Azijos - vieną (apibraukta). Tačiau filogenetinė LAT promotoriaus srities analizė neparodė reikšmingų skirtumų tarp „lietuviškų“ ir „švedišku“ *herpes simplex* viruso padermių, t.y., Švedijos (Upsalos) ir Lietuvos (Vilniaus) HSV-1 ir HSV-2 padermės nebuvo aiškiai atsiskyrusios vienos nuo kitų, nors galima išskirti HSV padermių klasterius, kur dominuoja lietuviškos sekos švedišku atžvilgiu ir priešingai.

Nei veido, nei genitalinės srities HSV padermės nebuvo atsiskyrusios vienos nuo kitų, taip pat kaip ir HSV padermės su nurodytu recidyvų dažniu nesudarė atskirų klasterių. HSV sekos, gautos iš to paties mėginio, buvo išsidėsčiusios viena šalia kitos, nors buvo kelios išimty.

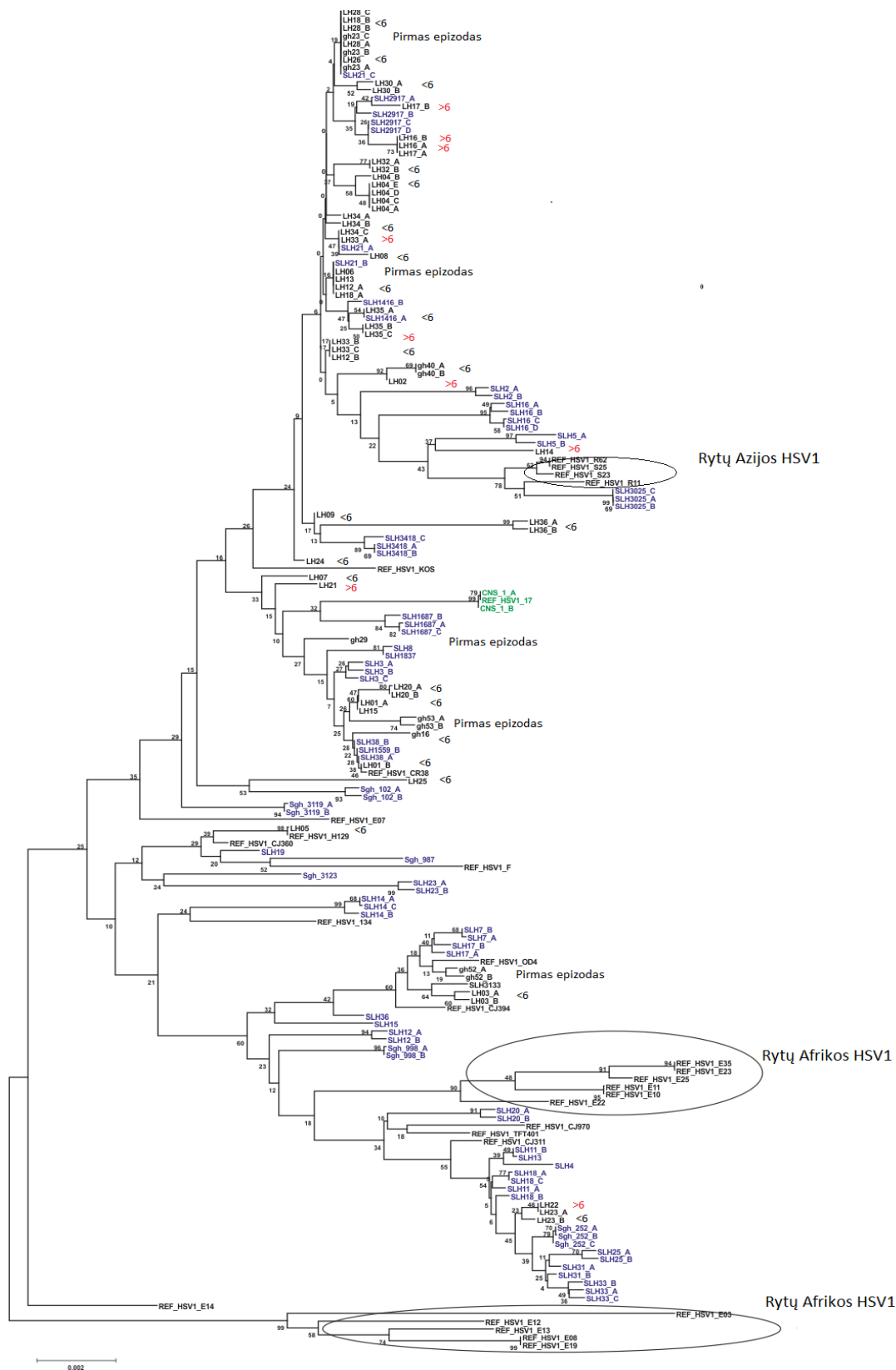
### Išvados

1. HSV-2 buvo pagrindinė lyties organų HSV infekcijos priežastis, tiek pirminės infekcijos (71%), tiek recidyvų (92%) metu. Visuose veido srities bėrimuose rastas HSV-1.

2. Ankstyva lytinio debiuto pradžia, didesnis turėtų lytinių partnerių skaičius, LPL ir oraliniai lytiniai santykiai - genitalinės *herpes* virusinės infekcijos rizikos veiksniai

3. HSV LAT promotoriaus sekos nustatytos 145 klinikiniuose mėginiuose, panaudojant naują PGR metodą. HSV LAT promotoriaus sekos yra gausios G+C ir turi variabilias homopolimerinių nukleotidų sritis, kurios varijuoja tarp viruso padermių ir pačių padermių viduje. Ši variacija gali turėti įtakos baltymų sintezei, o drauge ir fenotipo pokyčiams

4. Nenustatytas ryšys tarp HSV LAT promotoriaus sekų įvairovės ir HSV patobiologinių savybių, t.y. infekcijos recidyvų dažnio ir anatomicinės srities. HSV padermių iš Lietuvos ir Švedijos LAT promotoriaus sekos yra artimos geografiniu požiūriu.



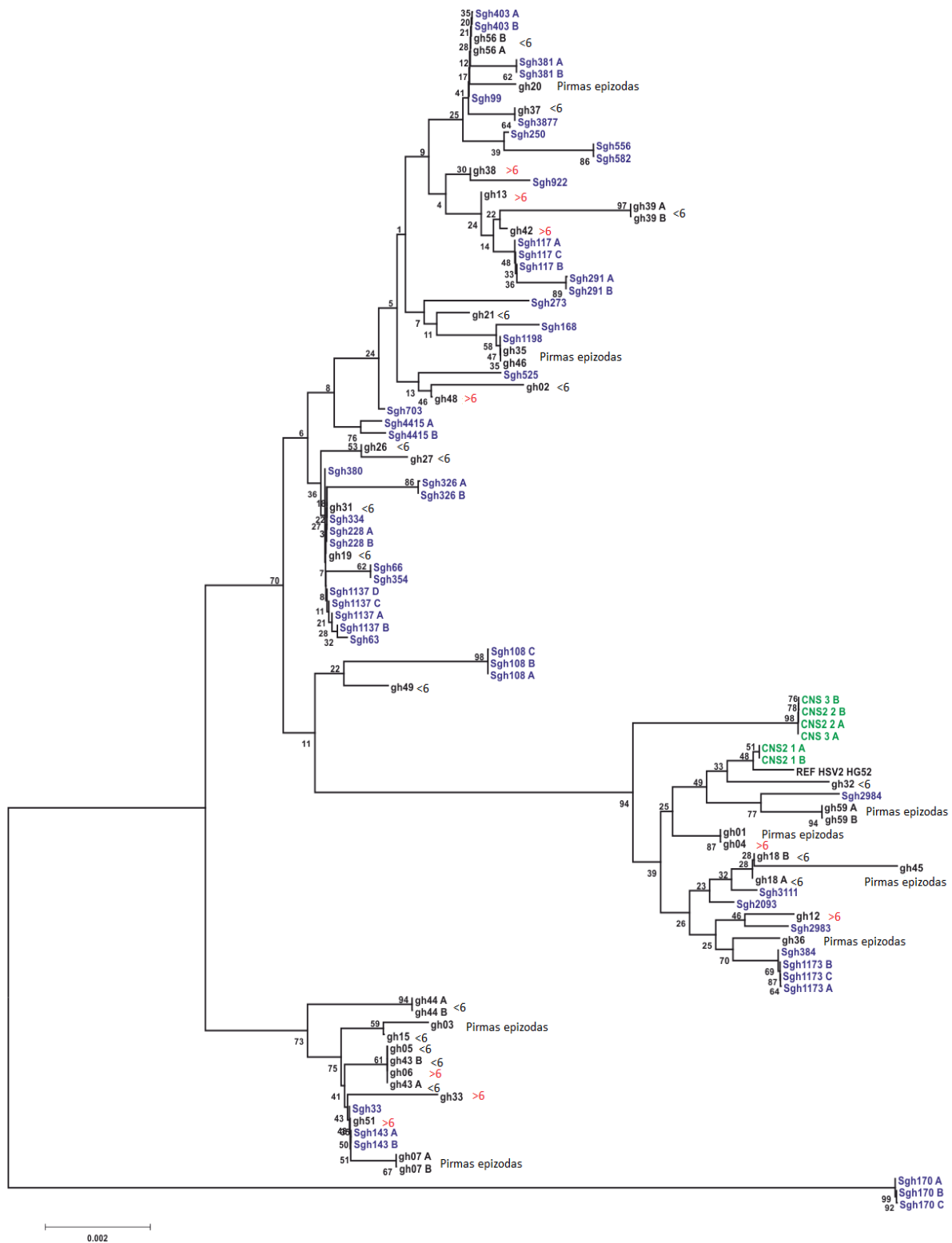
**15 pav. HSV-1 filogenetinis medis.** LH – veido srities Vilniaus HSV padermės (juoda spalva), SLH – veido srities Uppsalo HSV padermės (mėlyna spalva), gh – lytinių organų srities Vilniaus HSV padermės (juoda spalva), Sgh – lytinių organų srities Uppsalo HSV padermės (mėlyna spalva).

Recidivų dažnis (<6 ar >6 recidivai/metus) ar pirmas HSV-1 infekcijos epizodas.

CNS – centrinė nervų sistema (encefalitas) (Uppsalo HSV-1 padermės - žalia spalva),

REF – referentinės HSV-1 sekos iš Genų banko duomenų bazės





**16 pav. HSV-2 filogenetinis medis.** gh – lytinių organų srities Vilniaus HSV padermės (juoda spalva), Sgh – lytinių organų srities Upsalos HSV padermės (mėlyna spalva).

Recidyvų dažnis (<6 ar >6 recidyvai/metus) ar pirmas HSV-2 infekcijos epizodas.

CNS – centrinė nervų sistema (meningitas) (Upsalos padermės - žalia spalva),

REF – referentinės HSV-2 sekos iš Genų banko duomenų bazės

## **Praktinės rekomendacijos**

1. PGR testo teigiamas vertinimas priklauso nuo mėginio paėmimo laiko ir HSV infekcijos bėrimų pobūdžio. PGR paprastai yra teigiama, esant negydytomis HSV sukeltoms opelėms, tačiau jei pradinis PGR testas pacientui, kuriam įtariama *herpes simplex* viruso infekcija, yra neigiamas, rekomenduojama tyrimą kartoti vėlesnių epizodų metu.

2. Rekomenduojama paimtus HSV mėginius iki ištyrimo laikyti tuščiuose Eppendorf mėgintuvėliuose be buferinio tirpalo kambario temperatūroje, kadangi tai yra patogiu ir efektyvu nustatant HSV DNR PGR metodu.

3. Kadangi gautos 145 HSV LAT promotoriaus srities sekos bus patalpintos Genų banko duomenų bazėje ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), jos turėtų būti naudingos tolesniuose moksliniuose tyrimuose, nagrinėjančiuose *herpes simplex* viruso patogenezę, latencijos ir reaktyvacijos aspektus, kuriant naujus antivirusinius vaistus.

## PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMA

### PUBLIKACIJOS

- **Aukštuolienė E**, Ambrozaitis A, Friman G, Barkevičienė D, Blomberg J. Kiekybinis ir kokybinis *herpes simplex* viruso DNR nustatymas lytinių organų bėrimuose. Medicinos teorija ir praktika. 2012;18(4.2): 349-355 (Index Copernicus).
- **Aukštuolienė E**, Ambrozaitis A, Friman G, Barkevičienė D, Blomberg J. Su latencija susijusio geno vaidmuo *herpes simplex* viruso latencijos reaktyvacijos cikle. Medicinos teorija ir praktika. 2012;18(4.2): 614-620 (Index Copernicus).

### PRANEŠIMAI

- **Aukštuolienė E**, Ambrozaitis A, Friman G, Blomberg J. Kiekybinis ir kokybinis *herpes simplex* viruso DNR nustatymas lytinių organų bėrimuose. Elektroninis pranešimas. Tarptautinė Konferencijoje „Evoliucinė medicina: nauji senų problemų sprendimo būdai“. Vilnius, Lietuva, 2012 m. birželio 12-15d.

## PADĖKA

*Nuoširdžiai dėkoju savo vadovams:*

**Prof. habil. dr. Arvydui Ambrozaičiui**, VU Infekcinių, krūtinės ligų, dermatovenerologijos ir alergologijos klinikos vedėjui, doktorantūros studijų vadovui, už suteiktą galimybę pradėti tyrimus *herpes simplex* infekcijos srityje ir pagalbą visų studijų metu.

**Prof. dr. Jonas Blomberg**, Upsalos universiteto (Švedija) Medicinos mokslų departamento Klinikinės virusologijos padalinio vadovui už suteiktą progą atlikti šį tyrimą jo vadovaujamoje laboratorijoje, už supažindinimą su virusologija ir molekuline biologija, neįkainojamą paramą kuriant mokslines idėjas, už pastovią praktinę pagalbą ir begalinį entuziazmą.

**Prof. dr. Goran Friman**, Upsalos universiteto (Švedija) Medicinos mokslų departamento Infekcinių ligų klinikos vadovui už mokslinę pagalbą ir draugiškumą viešnagių Švedijoje metu.

*Taip pat norėčiau išreikšti nuoširdžių padėką:*

**Dr. Guma Abdeldeim**, kuris išmokė mane pagrindinių molekulinės biologijos tyrimo metodų.

**Birgitai Sembrant** už jos geranoriškumą, pagalbą ir palaikymą.

**Prof. dr. Kęstučiui Žagminui** už pagrindinių statistikos metodų mokymą.

**Dr. Amal Elfaitouri** and **Agnes Wiener**, mano kolegėms, už jų draugystę, įdomias diskusijas, draugiją viešnagės Švedijoje metu.

**Kolegoms iš Upsalos** universitetinės ligoninės Mikrobiologijos skyriaus ir Klinikinės virusologijos padalinio, Upsalos universiteto Medicinos mokslų departamento ir **kolegoms iš Lietuvos** iš VUL Santariškių klinikos Dermatovenerologijos centro, „Vilniaus lazerinės dermatologijos centro“ už pagalbą ir palaikymą.

**Gintarui ir Nojui**, mano mylimai šeimai, už meilę ir begalinę kantrybę. Mano tėveliams, **Almai ir Pranui**, kurie niekada nenustojo tikėti manimi ir mane drąsino, už jų meilę ir palaikymą.

Šis tyrimas buvo paremtas Olinder-Nielsen šeimos fondo lėšomis (Švedija).

## **INFORMACIJA APIE AUTORE**

**Eglė Aukštuoliene**

**GIMIMO DATA** 1975 m. liepos 30 d.

**DARBOVIETĖ** VšĮ VUL Santariškių klinikos,

Dermatovenerologijos centras, Kairiūkščio g. 2, LT-08411, Vilnius

**ELEKTRONINIS PAŠTAS** [egle.aukstuoliene@gmail.com](mailto:egle.aukstuoliene@gmail.com)

### **IŠSILAVINIMAS**

1993-1999 Vilniaus universitetas, gydytojo kvalifikacija

1999-2000 Pirminė rezidentūra, VšĮ VUL Santariškių klinikos Centro filialas

2000-2002 Vidaus ligų rezidentūra, VšĮ VUL Santariškių klinikos

2002-2004 Dermatovenerologijos rezidentūra, VšĮ VUL Santariškių klinikos

Dermatovenerologijos centras

2005–2012 Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Infekcinių, krūtinės ligų, dermatovenerologijos ir alergologijos klinika, doktorantė

### **DARBINĖ VEIKLA**

Nuo 2004 m. Gydytoja dermatovenerologė, VšĮ VUL Santariškių klinikos,

Dermatovenerologijos centras

Nuo 2006 m. Gydytoja dermatovenerologė, „Vilniaus lazerinės dermatologijos centras“

Nuo 2011 m. Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Infekcinių, krūtinės ligų, dermatovenerologijos ir alergologijos klinika, asistentė

### **STAŽUOTĖS UŽSIENIO MOKSLO INSTITUCIJOSE**

1998, 1999, 2002 Stažuotės universitetinėse ligoninėse Italijoje (Kardiologijos skyrius (Mesina), Vidaus ligų skyrius (Brescia), Dermatologijos skyrius (Pavija)),

2003 09 29-10.03. Infekcinių ligų molekulinės biologijos kursai Upsalos universitete (Švedija)

2004-2010 1 - 4 mėnesių per metus mokslinės stažuotės Upsalos universitete (Švedija), gilinant žinias Herpes simplex infekcijos diagnostikos srityje

2011 07 26-30 Tarptautinė vasaros dermatovenerologų mokykla, Miunchenas, Vokietija

### **NARYSTĖ**

Nuo 2003 m. Lietuvos dermatovenerologų draugijos narė

## SUMMARY

**Introduction.** Herpes simplex virus (HSV) is one of the most common infectious pathogens in humans. Two types of HSV (i.e., HSV-1 and HSV-2) are distinguished by antigenic differences in their envelope proteins (Beauman, 2005).

HSV causes recurrent orofacial and genital infections (Bloom et al., 2010), sometimes disseminated or visceral diseases. HSV is transmitted during close contact with a sore or fluid from an infected person, including birth-acquired herpes that newborn gets from the infected mother during birth (Whitley and Roizman, 2009).

Herpes simplex virus has the capacity to invade CNS, replicate in neurons and establish a latent infection (Whitley and Roizman, 2009). After establishment of latency in sensory neurons HSV persists for the lifetime of the host (Perng et al., 2002). From this site virus can reactivate and be transported to the skin where virus-laden vesicles occur (Gupta et al., 2007). Some patients get more frequent and intense reactivations than others (Whitley and Roizman, 2009; Arduino and Porter, 2008). Nevertheless infection with herpes simplex virus is a widespread disease, only a few patients present with typical vesicular and ulcerative lesions.

Herpes simplex infection is an incurable disease. Available antiviral drugs inhibit HSV replication but do not affect the latent reservoir of HSV (Knipe and Cliffe, 2008). The mechanisms by which latency occurs, are unclear (Perng et al., 2002). It was discovered that HSV genome was not completely quiescent during latency; all genes are suppressed except the latency associated transcripts which are transcribed from the latency associated gene (LAT) (Stevens et al., 1987; Rock et al., 1987). The expression of LAT is under the control of the LAT promoter (LAP), which is a segment of DNA occurring upstream from a LAT gene coding region. It is established that HSV-1 and HSV-2 LAT promoter mutants have lower levels of spontaneous reactivation rates than wild type HSV in rabbits (Perng et al 1994, 1996), mice (Perng et al, 2001) and guinea pig (Krause 1995) models. All previous LAT promoter studies have been conducted using small animals (mouse, rabbit, guinea pig) models. Especially little work has been done with HSV-2 (Wang et al 1997). However, the variation in the LAT promoter has not been studied in viruses from clinical samples, and it is not known whether this variation has any bearing on the tendency for reactivation, anatomical site and geographical distribution in humans.

This study consists of the clinical and experimental parts and deals with HSV DNA detection, quantification and typing of HSV in skin lesions, risk factors for genital herpes and sequence variation in LAT promoter in clinical samples from patients with herpes simplex infection. Samples from genital and orofacial lesions were obtained in Lithuania (Vilnius) and were used in the clinical part of the study meantime both Lithuanian and Swedish (Uppsala) clinical samples were analyzed in the experimental part.

### **Aim of the study**

To evaluate the sequence variation in *herpes simplex* virus latency associated gene promoter by developing and applying molecular methods and correlate with clinical features.

### **Objectives of the study**

1. To type and quantify the amount of *herpes simplex* virus in skin lesions of suspected herpetic origin with the quantitative real time PCR method
2. To evaluate the possible risk factors for genital herpes
3. To develop new PCR assay for HSV-1 and HSV-2 LAT promoter analysis; to clone difficult to sequence due to G+C richness LAT promoter regions.
4. To estimate the variability of LAT promoter sequences; to evaluate relation between HSV strains regarding the rate of recurrence, anatomical site of HSV infection and geographical distribution.

### **Scientific novelty of the study**

Detection, quantification and typing of the HSV DNA in the skin lesions was never performed in Lithuania before. For the first time we evaluated risk factors for genital herpes in Lithuania.

This is the first so extensive study of the LAT promoter region from the clinical samples worldwide. For the first time we mapped the variability of the HSV LAT promoter region, without the possible confounding effects of cell culture. We developed a new PCR assay for the LAT promoter region and analyzed 145 clinical samples. The analysis of the LAT promoter variability in Lithuanian HSV strains was performed regarding the rate of recurrences, anatomical site of HSV infection. For the first time we performed phylogenetic analysis and compared HSV LAT promoter region in HSV strains obtained from Lithuania and Sweden.

### **Practical value of the study**

Our results show that HSV-2 is the main cause of genital herpes and that some patients are unaware of having HSV (i.e., are seropositive but have never experienced clinically apparent episodes of herpes simplex infection) therefore shedding and transmission of HSV can occur.

Since the clinical diagnosis of HSV infection (especially in genital herpes) is not always specific and the type of HSV affects prognosis and subsequent counseling, virological and type-specific serological tests should be used routinely to confirm HSV diagnosis and to distinguish HSV-1 from HSV-2 infection.

Informing patients about the risk of transmission and sexual behaviour is important and could help to prevent the spread of disease and neonatal complications. The recognition of atypical features of HSV infection may help to avoid unnecessary and costly investigations and treatments for others though clinically similar-appearing disorders.

The experimental part of this study showed variable repeated sequences of DNA in LAT promoter region within and between HSV strains. When these sequences are deposited in GenBank they will be a lasting resource for further research of HSV pathogenesis, aspects of latency, evolution and may be a basis for future HSV therapies.

### **Defended statements of the dissertation**

- HSV-2 is the main cause of genital herpes; HSV-1 is found more often in orofacial region.

- Higher number of lifetime sexual partners, early age at first intercourse, history of sexually transmitted infections (STI), practice of oral sex are the risk factors for the acquisition of genital herpes.
- LAT promoter region contains hypervariable repeats which differ between and within strains. There was no relation between variation in the LAT promoter region and frequency of recurrence, the site of infection and geographical distribution.

## **Materials and methods**

### **Study population of the clinical part of the study**

***The patients' group.*** Fifty-four patients with typical and atypical symptoms and signs suspected for genital herpes infection (vesicles, erosions, crusts, erythema, dysuria, vaginal discharge, soreness, itching) and 37 patients with lesions suspected for orofacial herpes were enrolled into the study. ***The control group*** was composed of fifty subjects without any complains and signs of genital herpes.

### **Study materials of the experimental part of the study**

***Collection of clinical samples.*** In total, 146 clinical samples were collected: 72 from Lithuanian patients and 74 from Swedish patients. Among 72 patients from Vilnius, 32 HSV-1 samples were obtained from oro-facial and 6 from genital lesions, HSV-2 was detected in 34 genital swabs. Among 74 patients from Uppsala, 30 swabs from the oro-facial region and 6 swabs from genital region were positive for HSV-1, 34 swabs from genital region were positive for HSV-2. Four cerebrospinal fluid samples were taken from Uppsala patients with CNS infection: 1 sample was positive for HSV-1 and 3 were positive for HSV-2. HSV positivity was determined using quantitative real-time PCR.

**Methods of the clinical part of the study.** Two specimens from each patient for quantitative PCR from the skin lesions were taken using cotton-tip swabs: „wet“ swab was inserted into a tube containing 0.4 mL 10 mmol/L Tris-HCL buffer with 10 mmol/L EDTA and kept frozen at -20°C, „dry“ one was kept in an empty tube at room temperature until DNA extraction. ***Quantitative real-time PCR*** for herpes simplex virus detection and typing was performed as previously described by Filén et al. (Filén et al., 2004) using RotorGene 2072 thermal cycler (Corbett Research, Australia). Ten microlitres of extracted DNA was added to each PCR tube. Blood samples were drawn from both patients and controls and were tested for anti-HSV-1 IgG and anti-HSV-2 IgG antibodies using ***ELISA*** method. ***Questionnaire*** survey concerning socio-demographic data, history of herpes infection, sexually transmitted diseases and sexual behavior was performed.

**Methods of the experimental part of the study. Amplification of HSV LAT promoter sequences.** For analysis of the LAT promoter an array of PCRs which cover this region of both HSV-1 and HSV-2 has been developed. The primers for amplification and sequencing were designed following the target sequences presented in GenBank (GenBank accession No NC\_001806 for HSV-1, No NC\_001798 for HSV-2) and were analyzed by OLIGO Analyzer 1.0.2. To amplify the LAT region a touchdown hot start PCR was performed. For low HSV copy numbers HSV-1 and HSV-2 samples nested touchdown hot start PCR was performed. ***Sequencing of HSV LAT promoter region.*** Sequences of amplified DNA were determined using ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction kit (Applied Biosystems, USA) on



an ABI 3130 Genetic Analyzer or at the Uppsala Genome Center on an ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). ***Cloning of HSV LAT promoter sequences.*** Difficult to sequence amplified LAT promoter GC-rich regions were cloned into TOPO<sup>®</sup>TA vectors and transformed into competent Escherichia coli cells (TOPO 10) using the TOPO<sup>TM</sup>TA Cloning kit (Invitrogen, Sweden). All inserts were sequenced using the ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction kit as described above. ***Sequence alignment and phylogenetic analysis.*** The sequencing data were analyzed using DNA Baser v2.80.0 (HeracleSoftware, Germany). The sequences were either aligned using the ClustalW2, ClustalW1.83 or MUSCLE programs. Cladograms or phylograms were constructed for phylogenetic analysis. In an attempt to display the degree of similarity of aligned nucleotide sequences, plots were created using SimPlot program (Lole et al., 1999).

**Statistical analysis.** Descriptive statistics of continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). For comparison of two groups in respect of a continuous variable t - test or non - parametric Man - Whitney test (in case of the asymmetric distribution) was applied. For the analysis of categorical data  $\chi^2$  or Fisher's exact test was used. Bivariate multiple logistic regression method was applied for the assessment of relation between genital herpes and risk factor. The statistical significance level was chosen  $\alpha=0.05$ , the results were regarded as statistically significant when  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis was performed on SPSS 19.0 software (version for windows).

## **Results**

### **Genital HSV infection**

Out of 54 patients with suspected genital herpes, genital HSV infection was diagnosed in 83.3% (45/54) patients: 74.1% (40/54) patients had a positive PCR for herpes simplex virus; 9.2% (5/54) patients had negative PCR but anti-HSV-2 IgG antibodies, indicative for genital herpes, were detected in their sera.

**Characteristics of the population.** The patients group with confirmed diagnosis of genital herpes consisted of 17 (37.8%) males and 28 (62.2%) females, mean age  $35.7 \pm 12.3$ . The control group of 50 subjects consisted of 15 (30%) males and 35 (70%) females, mean age  $39.4 \pm 10.3$ . The majority of the patients and controls were married or cohabiting, had university education and were employed. Both study groups were similar regarding gender, age, education and social status.

**Risk factors for genital herpes.** There was strong association between genital herpes and higher number of lifetime sexual partners, younger age at first intercourse, history of other STIs and oral sex. Condoms were used more frequently in the group of controls comparing with the patients (19/50 (38%) vs. 9/45 (20%),  $p < 0.001$ ).

**Serological assesment.** Anti-HSV1 IgG antibodies were detected in majority of patients (39 (86.7%)) and controls (45 (90%)). Seropositivity for HSV-2 was significantly more frequent in patients than in controls (68.8% vs. 14%).

**Clinical picture, HSV detection in genital lesions and serology.** „Wet“ swabs from genital lesions were analyzed with quantitative real-time PCR. HSV DNA was detected in 40 (74.1%) patients: in 14 (35%) males and 26 (65%) females. Most of the swabs (85%) were positive for HSV-2. Only 6 swabs (15%) were positive for HSV-1. Fourteen patients (35%) with positive PCR reported **first episode** of genital herpes lasting from 1 day up to 3 weeks. Four patients (29%) were positive for HSV-1, 10

(71%) patients – for HSV-2. Twenty-six patients (65%) presented with **recurrent** HSV infection: HSV-1 was detected in 2 (8%) patients, HSV-2 – in 24 (92%) patients. The duration of recurrent lesions varied from 1 to 14 days. The amount of virus in recurrent lesions ranged from 56 to  $3.9 \times 10^6$  (median  $1.2 \times 10^5$ ) copies/PCR reaction but the quantity of HSV was lower than during first episode (range  $106-2.2 \times 10^7$ , median  $2.6 \times 10^5$ , Mann-Whitney U test:  $U=154$ ,  $p=0.535$ ). Almost all patients (97.5%) with positive qPCR had vesicles and/or ulcers at the time of sampling. More than half of the patients (65%) had symptoms for less than 5 days. Meanwhile, in the group of the patients with negative PCR 3 (60%) persons presented with ulceration and all 5 patients suffered from lesions for more than 5 days. Out of 40 patients with positive DNA, 34 (85%) were HSV-2 seropositive. Five patients with negative HSV DNA had antibodies to HSV-2.

### **Orofacial HSV infection**

Out of 37 patients with suspected orofacial *herpes simplex* infection HSV was detected in 32 (86.5%) samples. Serology test for anti-HSV-1 IgG was positive in 35 patients. Two patients with negative PCR reported recurrent episode although they both were seronegative (both to HSV-1 and HSV-2).

**Characteristics of the population.** Among the 35 patients with diagnosed orofacial herpes infection 12 (34%) were male and 23 (66%) were female, mean age  $39.1 \pm 15.7$  (range 19-75). There was no significant difference regarding socio-demographic data between the patients and the control group.

**Serological assessment.** The majority of the patients with orofacial herpes and controls were seropositive for HSV-1 (97.1% vs. 90%). Both anti-HSV-1 IgG anti-HSV-2 IgG antibodies were detected in 1 patient and 7 controls.

**Clinical picture, HSV detection in orofacial lesions and serology.** More than half (68.8%) of the patients with positive qPCR in orofacial swabs had vesicles or ulcers at the time of sampling. Symptoms duration varied from 1 to 4 days; except one patient who had labial herpes for 5 days. All 32 individuals with positive PCR suffered recurrent episode, except one patient. Thirty one (96.9%) patients with orofacial herpes declared symptoms duration less than 5 days meantime in the group of negative PCR lesions lasted for more than 5 days and only crusting lesions were detected. The amount of virus in recurrent lesions ranged from 90 to  $57 \times 10^6$  (median  $5.7 \times 10^5$ ) copies/PCR reaction (mean  $29 \times 10^5 \pm 1 \times 10^7$ ). The majority of patients were seropositive for HSV-1 and seronegative for HSV-2. One patient with positive PCR (HSV-1) was seropositive for both viruses.

**„Dry“ swabs from orofacial and genital lesions.** All „dry“ (i.e., without buffer) swabs has been also analyzed by qPCR nevertheless they were collected as a reserve. All PCR results correctly corresponded between „dry“ and „wet“ swabs, except one. The latter was the sample from genital lesions: „wet“ swab was positive for HSV-1 meantime „dry“ one was negative: maybe this could happen due low copy number of HSV in genital lesions.

### **Experimental part of the study**

HSV-1 and HSV-2 LAT regions containing the LAT promoter were sequenced in this study. The HSV-1 LAT region includes the UOL (upstream of LAT) gene which is transcribed in the same direction as LAT and is supposed to encode a protein of 96 amino acids (Naito et al, 2005). UOL was also analyzed.

**Homopolymer tracts in HSV-1.** After sequencing and alignment of the LAT promoter sequences, five homopolymer tracts (HPTs) with variable nucleotide number were detected in HSV-1 LAT promoter region: two poly(C) (**Poly(C<sub>n</sub>)1** and **Poly(C<sub>n</sub>)2**), one poly(T) (**Poly(T)**) and two poly(G) (**Poly(G<sub>n</sub>)1** and **Poly(G<sub>n</sub>)2**) We focused on homopolymer sequences with a cutoff of 7 mononucleotides per HPT in this work.

**Recurrence rate.** Data about recurrence rate of HSV infection was available from Lithuanian patients. Out of 37 HSV-1 Lithuanian samples 32 were taken during recurrent, 5 during first episode of HSV infection. The recurrences varied from less than 1 recurrence up to 10 recurrences per year. In this study recurrence rate is divided into 3 categories: very low ( $\leq 1-2$ ), low (3-5) and high ( $\geq 6$ ) recurrences per year.

**Poly(G<sub>n</sub>)1.** Most of the HSV-1 samples (63/75 84%) had an imperfect homopolymer sequence „GGGGGAGG“ at nucleotide position 118297-118304, same as presented in the reference strain 17. However, due to deletion of deoxyadenosine, 6 variants of sequences with poly(G<sub>n</sub>) ranging from 7 to 12 nucleotides were detected in 12 samples. Among recurrent samples 3 variants of poly(G) were distinguished where GGGGGAGG dominated and was equally distributed between categories of very low and low recurrences, 6 variants showed 6 or more recurrences per year. Both G<sub>9</sub> and G<sub>12</sub> get into the very low rate category.

**Poly(C<sub>n</sub>)1.** Number of „C“ residues in this region (C<sub>10</sub> region at nucleotide position 118568-118577 of HSV-1 reference strain 17) varied from 7 to 15 and showed 8 variants. This mononucleotide tract overlaps with UOL in sense direction. The majority of poly(C) tracts (57/75 76%) were composed of 7-10 „C“ residues, C<sub>7</sub> being dominant in Swedish samples and C<sub>9</sub> in Lithuanian, respectively. Mutations in this region due to expansion and contraction of HPTs could affect upstream of LAT (UOL) protein synthesis. As already mentioned, C<sub>9</sub> variant dominated between Lithuanian sequences and there was not significant difference between the categories of recurrence rate.

**Poly(G<sub>n</sub>)2.** This SSR was composed of imperfect sequence „G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>“ located at nucleotide positions 118953-18966 of HSV-1 strain 17 just upstream of AL2 (between AL and AL2). Several samples due to the poly(G) tract reaching up to 12 „G“ were cloned because in some samples with long polyG we couldn't get reads from both ends. Sequence „G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub>“ was more prevalent in Lithuanian samples (28/37 75.7%) comparing with Swedish (13/38 34.2%). There were found 6 variants among 37 Lithuanian sequences and 8 among 38 Swedish, respectively. All Swedish genital samples had the G<sub>5</sub>TG<sub>n</sub> genotype while Lithuanian samples of genital herpes contained both G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub> (4 out of 6) and G<sub>5</sub>TG<sub>n</sub> genotype. All clones from the same patient were with the same fixed number of „G“ residues and were nicely readable. The HSV-1 sequence G<sub>5</sub>TG<sub>2</sub>TG<sub>5</sub> was dominant in all three categories of recurrence rate.

**Poly(T<sub>n</sub>) and Poly(C<sub>n</sub>)2 regions** are located 46 nucleotides apart. **Poly(T<sub>n</sub>)** and **Poly(C<sub>n</sub>)2** regions were cloned in 18 Lithuanian and 20 Swedish samples.

The **Poly(T<sub>n</sub>)** (119301-119309 nucleotide position of reference strain 17) tracts ranged from 9 to 30 „T“ nucleotides. We detected a variable number of „T“ residues in different clones in different samples and even in different clones from the same patient. In spite of this variability, the means of each length category divided samples into two categories (data not shown), those with long poly(T) repeats (16-30 nt) and those with short poly(T) stretches with 9-13 nucleotides. The total number of long

poly(T)  $\geq$  16 nt (ranging from 16 to 30) occurred in 27 samples, while 48 samples had short poly(T) sequences. Interestingly, short poly(T) repeats were dominant (32/38 84.2%) in Swedish samples, while poly(T) stretches of Lithuanian samples were mostly long (21/37 56.8%). Out of 32 patients with recurrent infection long poly(T) profile of the LAT promoter sequences was identified in 18 samples and short poly(T) in 14 samples, respectively. There was no significant difference between recurrence rate and poly(T) profile.

**Poly(C<sub>n</sub>)2.** This homopolymer „C“ region is located 46 nucleotides downstream of the poly(T) region (119356-119365 nucleotide positions of reference strain 17). Six samples, 3 Lithuanian and 3 Swedish, were 14 nucleotides long, 1 Lithuanian sample had 15 Cs, others varied from 7 to 13 nucleotides, mostly 9-11 „C“ residues. The longest poly(C<sub>14-15</sub>) stretches were detected in 4 samples from the patients with 1 or less recurrences per year. C<sub>9</sub> - C<sub>12</sub> were dominant among the variants of Poly(C<sub>n</sub>)2 in both Swedish and Lithuanian samples.

In contrast to the poly(G) stretches in the **Poly(G<sub>n</sub>)2** region, we detected a variable number of „T“ and „C“ residues both in different clones from the same patient and in different samples, in both **Poly(T<sub>n</sub>)** and **Poly(C<sub>n</sub>)2** regions. Thus, these HPTs displayed both intra- and interindividual variability.

**Homopolymer tracts in HSV-2.** Three variable homopolymer regions **Poly(G<sub>n</sub>)1**, **Poly(C<sub>n</sub>)** and **Poly(G<sub>n</sub>)2** were detected in the HSV-2 LAT region containing the LAT promoter.

**Recurrence rate.** As in HSV-1, data regarding recurrence rate of HSV-2 are known in the group of Lithuanian patients. Out of 34 Lithuanian patients with HSV-2 genital herpes 25 stated recurrent episode and 9 - first episode of infection. The recurrences varied from less than 1 recurrence up to 15 recurrences per year.

**Poly(G<sub>n</sub>)1** region (119340-119350 nucleotide positions of HSV-2 reference strain HG52) showed 3 types of sequences: „CCCGCGTGCCG“, „CCCGCGGGCCG“ and „TTG<sub>n</sub>“. The sequence „CCCGCGTGCCG“ was dominant and almost equally distributed between Lithuanian and Swedish samples. Homopolymer „G“ sequences were detected only in 17/71 (23,9%) samples. Poly(G) stretches showed 4 variants of „G“ residues ranging from 9 to 12 nucleotides with G<sub>9</sub> and G<sub>10</sub> variants being most prevalent. The majority of the patients with the sequence CCCGCGTGCCG had up to 6 recurrences of genital herpes per year. TTG<sub>9-11</sub> variants have not been found in the group of very low rate of recurrences.

**Poly(C<sub>n</sub>)** and the downstream **Poly(G<sub>n</sub>)2** are located 75 nucleotides apart from each other. As in HSV-1, 7 Lithuanian samples and 13 Swedish had to be cloned together due to failure to get reads from both ends.

**Poly(C<sub>n</sub>)** tract (120065-120079 nucleotide position in strain HG52) showed a variable number of „C“ ranging from 9 to 14. Among Lithuanian samples the variant with 12 „C“ residues was most prevalent, while in Swedish samples 13 „C“ predominated. The sequence variants with 11, 12 and 13 „C“ residues were distributed equally in all 3 recurrence rate categories except sequences C<sub>10</sub> which were found only in the group of very low recurrences ( $\leq$ 1-2/year). Variant C<sub>14</sub> was absent in the group of Lithuanian samples.

**Poly(G<sub>n</sub>)2** region (120154-120166 nucleotide positions in strain HG52) contained homopolymer tracts of „G“ residues ranging from 8 to 17. The number of 9

„G“ residues was the most prevalent in Lithuanian samples, G<sub>12</sub> – in Swedish samples. G<sub>9</sub> was distributed almost equally in all categories of recurrences. G<sub>9</sub> was dominant in the category of low recurrences, G<sub>10</sub> – very low, and G<sub>11</sub> in high rate category, respectively. The patient with the longest HSV-2 HPT composed of 17 nucleotides suffered from recurrences twice per year.

In HSV-2 samples, as in HSV-1 samples, variable number of „C“ and „G“ residues in **Poly(C<sub>n</sub>)** and **Poly(G<sub>n</sub>)<sub>2</sub>** regions both in different clones from the same patient and in samples/strains from different patients were detected.

**The simplots of HSV.** LAT promoter region show that the sequence variation is confined to a small number of sites. In HSV-1, some of these sites reside within the coding regions of the UOL, AL and AL2 proteins, and will influence the amino acid sequence of these proteins. One of the proteins, AL, also overlaps the transcriptional start site which is close to the TATAAA promoter signal. As there are no known proteins encoded from the HSV-2 LAT promoter sequence this variation cannot be placed in a protein context. There is no conspicuous difference in variability pattern between orofacial and genital HSV-1. The variation is independent of geography (the Vilnius-Uppsala comparison) and rate of recurrence in both HSV-1 and HSV-2. This indicates that the variation in the HSV LAT promoter region does not confer clear pathobiological variation.

**Phylogenetic analysis of the LAT promoter sequences.** After sequencing of the LAT promoter region from HSV-1 and HSV-2 clinical samples, other HSV-1 strains (17, F, H129, KOS, CJ311, CJ360, CJ394, CJ970, CR38, OD4, 134, E25, E03, E07, E08, E10, E11, E12, E13, E14, E19, E22, E23, E35, F06, R11, R62, S23, S25, TFT401) and HSV-2 strains (HG52, 333) were taken from the NCBI Reference Database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) for phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis did not reveal significant differences between Lithuanian and Swedish strains, nevertheless we can distinguish clusters where Swedish strains dominate upon Lithuanian and vice versa.

Both the cladograms and phylogenetic trees showed that the LAT promoter region had a geographically dependent variation, with East African HSV-1 strains occurring in two clusters, East Asian – in one cluster (encircled). The Uppsala and Vilnius HSV-1 and HSV-2 strains were not clearly separated. Neither were the labial and genital HSV-1 strains separated from each other. Sequences from the same sample clustered with each other, with few exceptions. The HSV strains with indicated recurrence rate were not clustered.

### **Conclusions**

1. HSV-2 was found to be the main cause of genital herpes in both first clinical (71%) and recurrent episodes (92%). All observed cases of orofacial herpes simplex infection were caused by HSV-1.

2. Higher number of lifetime sexual partners, early age at first intercourse, history of other STIs, practice of oral sex were the risk factors for acquisition of genital herpes.

3. The structure of the LAT promoter region was studied applying new PCR method in 145 HSV-1 and HSV-2 clinical samples. HSV LAT promoter is G+C rich and contains variable homopolymer tracts. We found an inter- and intrastrain variability of HPTs in the promoter region, potentially giving rise to a large variation at the protein level, leading to phenotypic variation.

4. HSV LAT promoter analysis did not reveal clinically important differences between HSV strains of persons with different rates of HSV recurrence, or between HSV samples obtained from different body sites. The HSV LAT promoter sequences of the samples obtained in Lithuania and Sweden were close to each other regarding the geography.

#### **Practical recommendations**

1. The diagnosis of genital herpes is significantly dependent on the time of sampling, even when PCR methodology is applied. PCR is usually positive if there are untreated visible ulcerated lesions but negative initial diagnostic tests in swabs from such lesions do not exclude HSV infection and subsequent repeated tests on a number of occasions should be performed for a definitive diagnosis in additional cases.

2. Storing samples before analysis as „dry“ swabs in Eppendorf tubes at room temperature enables HSV DNA detection and is convenient and effective for HSV DNA detection by PCR.

3. We analyzed 145 HSV LAT promoter sequences. When these sequences will be deposited in GenBank database they could serve as a long lasting resource for further HSV research and a basis for future HSV therapies.