جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الكشف الجزيئي والمناعي لفايروس BK Polyomavirus في المرضى الذين يعانون من اعتلال الكلى في محافظة ديالى

رسالة مقدمة لمجلس كلية العلوم- جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

زينة طالب عويد الخزرجي

بكالوريوس علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة ديالى/ 2005

بأشراف

د. ابتهال حميد محسن

(أستاذ مساعد)

2024م **1446 هـ**

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Diyala
College of Sciences
Department of Biology

Molecular and Immunological Investigation of BK Polyomavirus Infection in Nephropathy Patients in Diyala Governorate

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science, University of Diyala, in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Biology

By

Zinah Talib Owaid AL-Khazraji

B.Sc. Biology /College of Science / Diyala University, 2005

Supervised by

Dr. Ibtihal Hameed Mohsin

(Assistant Professor**)**

2024 A.D **1446 A.H**

1.1 Introduction

Nephropathy is a problem of kidney function or structure regardless of specific clinical presentation or cause and suggested a grading scheme based on glomerular filtration rate (GFR) level. Often starts with primary kidney damage and develops through the chronic kidney disease (CKD) stages toward the outcome of kidney failure. Through this development, humans are at an increasing risk of death and cardiovascular disease (CVD). Kidney loss is a potentially lethal illness since the kidneys' principal and most evident tasks are to eliminate waste products and manage the body's water and acid-base balance (Inker *et al*., 2014; Gatto *et al*., 2022).

There are many factors causing nephropathy, one of these factors are BK polyomavirus, BK virus (BKV) causes clinical problems in kidney transplant (KTR) patients, Ureteral stenosis with BK viruses associated nephropathy (BKVAN) are both conditions that can occur after kidney transplantation. Hemorrhagic cystitis can also occur following the transplantation of human stemming cells (Shah *et al*. 1973). BKVAN represents a major contributing factor to the failure of the transplant of kidney grafts (Kant *et al*., 2022). BKV mostly lives in kidney epithelial cells, although it can reactivate sometimes and cause viruria without any symptoms (Zhou *et al*., 2023).

The BK polyomavirus is a small virus (40 - 44 nm in diameter) of the Polyomaviridae family with a single molecule of circular non-enveloped double-stranded viral Deoxyribonucleic acid (DNA), cellular histones complexed with 5300 base pairs, encircled by a capsid carrying three virus-encoded proteins (VP1, VP2, and VP3) (Ambalathingal *et al* ., 2017; Zhou *et al* ., 2023). The BKV genome consists of three primary segments: the noncoding controlling region (NCCR), late virus genetic region (LVGR), along with the early virus genetic

region (EVGR). The EVGR encodes the early T proteins. BKV predominantly utilizes TAg-mediated modification for the genes that suppress tumors p53 as well as pRb for causing malignancy. This disrupts apoptosis and cell cycle (Zhao *et al*., 2016). The protein of viruses capsid are encoded by LVGR, and also by NCCR, which controls viral transcription and replication (Imperiale, 2007; Funahashi, 2021).

The BK polyomavirus (BKPyV) isolates have been found to have four primary genotypes of the virus: I, II, III, and IV (Doerries *et al*., 1994). About 80% of BKvirus cases that have been reported worldwide are associated with genotype I, with genotype IV accounting for 15% of cases, genotypes II and III are the least common (Kotla *et al*., 2021). All BK polyomavirus (BKPyV) genotypes have very high similarity (above 95%) in the VP1 coding region (Krumbholz *et al.,* 2008; Furmaga *et al*., 2021).

The most common way of spreading is supposed to occur across upper respiratory pathway, as evidenced by the presence of BK virus infection throughout respiratory system or tonsillitis in youngsters (Funahashim, 2021; Zhou *et al*., 2023). Additional pathways of transmission are transplacental, fecal-oral, and blood transfusion. According to several theories, the BKvirus enters the circulation through contaminated tonsil tissue, where it infects peripheral blood mononuclear cells and then traveling to other infection sites, such as the kidney (Furmaga *et al*., 2021). Following the initial infection's resolution, BK polyomavirus mostly lives for a lifetime in kidney epithelial cells, but can reactivate sometimes and cause asymptomatic viruria (Doerries, 2006).

The immune system plays a crucial role in both reactivating and inhibiting the virus, particularly in the case of the BKvirus. Anti-BKV T cells are essential

for limiting the spread of the viral infection. However, increasing immunosuppressive can lead to the inhibition of these T cells. Multiple studies indicate the fact that T lymphocytes (CD+8) are essential for eliminating viruses when viral infection level are actually very high. On the other hand, T cells that produce only one type of cytokine can be helpful in decreasing moderate level of viral infection (Espada *et al*., 2020; Kotla *et al*., 2021). The decreased incidence as well as removal of viral infection rely on an efficient cellular immunity, especially CD8 and CD4 cells playing a crucial role in this mechanism (Kaur *et al*., 2019).

The presence of BK virus genes in both urine and blood could be measured accurately utilizing a technique called polymeras chian reaction (PCR) analyses. This method is used to diagnose and monitor BK virus-associated nephropathy (BKVAN) in individuals who have received kidneys transplanted (Vera-Sempere , 2007; Halim *et al*., 2016) .Additionally, histological detection involves the identification of specific changes in cell structure when outcomes that are favorable about immuno analyses that use antibody specifically targeting a specific significant T antigens (Dalianis *et al.*, 2019). Responses from T cells are triggered by the bigger T antigen, virus capsid protein, as well as not structural protein. A type of marking along with the ELISA method can be employed for quantifying and measuring these reactions. The detection of BKVAN was linked to the utilization of ELISA technological advances, indicating a targeted immune system defense against this virus (Espada *et al*., 2020).

1.2 Aims of study

The aims of present study were to detect the BK polyomavirus genotypes and evaluate the association of BKPyV with nephropathy patients in Diyala governorate through the following stap:

1. Immunological detection of BK polyomavirus antibodies (antiBKV IgG,IgM) in serum of nephropathy patients by (ELISA).
2. Estimation of cytotoxic T lymphocyte (CD+8) concentration and evaluate their immune relationship to the BKV infection.
3. Genotyping of BKPyV using RT-PCR.
4. Identification of BKvirus diversity using molecular diagnostic methods include noncoding control region (NCCR), and early coding areas transcribe the tumorigenic proteins (LT- Ag).
5. Construction of BK polyomavirus phylogenetic tree isolated from nephropathy patients using bioinformatics tachniques (SnapGene Viewer ver. 4.0.4).

الخلاصة

يُوصَف اعتلال الكلية بأنه مشاكل في بنية أو وظيفة الكلية، بغض النظر عن السبب الكامن أو المظاهر السريرية المحددة. غالبًا ما يبدأ بتلف الكلى الأولي ويتقدم خلال المراحل إلى الفشل الكلوي. يعد فقدان الكلى مرضًا مميتًا محتملًا لأن المهام الرئيسية والأكثر وضوحًا للكلى هي التخلص من الفضلات وإدارة توازن الماء والقاعدة الحمضية في الجسم. هناك العديد من العوامل التي تسبب اعتلال الكلية، أحد هذه العوامل هو فيروس BK polyomavirus، اعتلال الكلية المرتبط بفيروس BK (BKVAN) هو سبب مهم لفقد الطعوم في عمليات زرع الكلى. أجريت الدراسة الحالية في محافظة ديالى -العراق خلال الفترة من تشرين الأول 2023 إلى اذار 2024 في مستشفى بعقوبة التعليمي، بعد الحصول على موافقة اللجنة العلمية لدائرة صحة ديالى بموجب الأمر الإداري المرقم (51043) بتاريخ 2023/09/25.

تهدف دراستنا الى التحقق من الانتشار المصلي لاضداد الفيروس التوارمي BK Polyomavirus وتقدير تركيز مستويات الخلايا اللمفاوية التائية السامة cytotoxic T lymphocyte (CD+8) لدى مرضى الاعتلال الكلوي في محافظة ديالى - العراق، والتشخيص الجزيئي لجين BKVP1 وتحديد الانماط الوراثية السائدة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي real time- polymerase chain reaction (RT-PCR)، وتحديد بعض المناطق الجينية لفيروس BK Polyomavirus مثل منطقة التحكم غير المشفرة Noncoding Control Region (NCCR) المسؤولة عن التضاعف والاستنساخ ، ومناطق التشفير المبكرة الناسخة لبروتينات المسببة للورم(LT- Ag)، واستخدام طرائق المعلوماتية الحيوية لتحليل نتائج التسلسل وتجميع بيانات التسلسل لبناء الشجرة الوراثية .

جمعت 130عينة دم من مرضى الاعتلال الكلوي ، شملت الدم الوريدي (المصل والبلازما) من مرضى الاعتلال الكلوي المشخصين في مركز ابن سينا لغسيل الكلى وقسم الكلى والمسالك البولية التابع للعيادة الاستشارية ومركز الأورام / مستشفى بعقوبة التعليمي، والعيادات الخارجية المتخصصة في الكلى والمسالك البولية المشخصين من قبل طبيب اختصاص بأمراض الكلى و40 عينة دم الوريدي للمتبرعين الاصحاء من المصرف الدم .

تم اخضاع مجاميع الدراسة للاختبارات المصلية باستخدام تقنية الأمتزاز المناعي المترابط بالإنزيم (ELISA) للكشف عن وجود اضداد فيروسBK Polyomavirus -IgG ، وكانت إيجابية في 130/98 (75.4%) من المرضى وفقط 40/5 (12.5%) في الأصحاء، بينما كانت اضداد فيروس BK

Polyomavirus- IgM إيجابيا في 130/20 (15.4٪) من المرضى ولم تظهر أي نتيجة ايجابية في الاصحاء، وتقدير مستويات الخلاياالليمفاوية التائية السامة cytotoxic T lymphocyte (CD+8) في الدم، والتي كانت 8.685 ± 2.458 في العينات الإيجابية لفحص اضداد فيروس BK Polyomavirus- IgM، بينما كانت 3.359 ± 1.096 في العينات السلبية لفحص اضداد فيروس BK Polyomavirus- IgM، مع وجود فرق معنوي كبير في قيمة P(<0.001).

ارتفاع متوسط مستوى اليوريا لدى المرضى المصابين بعدوى BKV عنه في المرضى الغير مصابين بعدوى BKV حيث بلغ 157.9 ± 77.88 في المرضى المصابين بالعدوى الإيجابية بينما كان 47.16 ± 4.498 في المجموعة السلبية، مع وجود فرق معنوي في قيمة P (0.001)، وكان متوسط الكرياتينين مرتفعًا جدًا في المجموعة الإيجابية للإصابة بـ BKV مقارنة بالمجموعة السلبية حيث بلغ 6.939 ± 1.662 في المجموعة الإيجابية وكان 3.820 ± 2.773 في المجموعة السلبية مع وجود اختلاف معنوي كبير في قيمة P (< 0.001).

كانت الفئة العمرية بين 56-70 عامًا هي أعلى مجموعة إيجابية لـ BKV IgG وIgM، والتي كانت 98/37 (37.8٪) و20/10 (50٪) على التوالي، في حين أن العمر> 70 عامًا كان أقل مجموعة إيجابية BKV IgG الذي كان 98/13 (13.2٪) والفئة العمرية أقل من أربعين عامًا كانت أقل مجموعة إيجابية لـ BKV IgM.

اما ما يتعلق بالجنس، كان الذكور أكبر مجموعة، ثم الإناث كانت 98/60 (61.2٪) و20/16 (80٪) في مجموعات BKV IgG وIgM الإيجابية، على التوالي مع وجود اختلافات كبيرة في قيم P , (< 0.05), (< 0.01).

وكان مرضى الفشل الكلوي أعلى مجموعة إيجابية لBKV IgG وIgM من المجموعات الأخرى المشمولة في هذه الدراسة، والتي كانت 98/51 (52٪)، و20/18 (90٪) على التوالي. جميع الأفراد الذين لديهم تاريخ زرع الكلى في مجموعة المرضى، كانوا إيجابيين لـ BKV IgG وIgM، وبالتالي فإن هناك علاقة إيجابية مع اضداد BK Polyomavirus- IgG, IgM، وخاصة مع BKV IgMحيث (R=0.513**). الأمراض الأخرى (مرض السكري، التهاب الكبد B، فيروس C، والأورام) كان لها علاقة إيجابية ايضا مع antiBKV (IgM) لمرضى اعتلال الكلية (R = 0.513 **).

اضافة الى ذلك، تم إجراء الكشف الجزيئي لفيروس التوارمي BK Polyomavirusبتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي (RT-PCR) واظهرت النتائج بان 20/8 إيجابية لجين BKVP1 وBKV وتحديد الانماط الوراثية فوجد النمط الوراثي الرابع (IV)هو الشائع في مرضى اعتلال الكلى في محافظة ديالى ، في حين ظهرت سلبية للأنماط الوراثية الأخرى (BKV- I, II, III). وايضا تم الكشف عن منطقة السيطرة غير المشفرة (NCCR) المسؤول عن تضاعف واستنساخ الفايروس والتي وجدت في 8/2 من عينات ايجابية الفحص لجين BKVP1، وكذلك الكشف عن جين مناطق التشفير المبكرة الناسخة لبروتينات المسببة للورم (LT- Ag)، والذي لم تظهرأي نتائج إيجابية في العينات ايجابية الفحص لجين BKVP1.

اختيرت انقى عينتين من عينات ايجابية الفحص لجين BKVP1 باعلى درجة نقاوة للحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA وتم قياس نقاوتها بجهاز NanoDrop, لاستكشاف تعدد الاشكال الجيني (التسلسل) لفيروس التوارمي BK Polyomavirus, ان العينات المدروسة مدمجة ضمن النمط الوراثي الرابع في مواقع تطورية قريبة الى العديد من السلالات المعزولة من الكويت ولا توجد مسافات نسبية بينهم. وبالتالي فان المتغيرات الفايروسية المرصودة قد تنشا من العزلات الكويتية التي تنتمي الى النمط IV. كما كشف تحليل التطور الوراثي ان العينات الفيروسية المعتمدة على جين VP1 للانماط الجينية IV, III, II تنحدر على التوالي من المصل I نظرا لقرب هذه المجموعه من جذور الشجرة.

كشفت ترجمة هذه الاختلافات إلى بقايا الأحماض الأمينية، وكشفت نتائج المحاذاة لعينات 230 نقطة أساس عن عدم وجود اختلافات في الحمض النووي مقارنة بالتسلسلات المرجعية لتسلسلات الفيروس التوارمي BK.

استنتجت الدراسة الحالية دور الاصابة بفيروس التوارمي BK polyomavirus بين مرضى الاعتلال الكلوي وخاصة في مرضى الفشل الكلوي الذين يخضعون لغسيل الكلى. هذا يشير إلى أن غسيل الكلى هو عامل خطر قوي لعدوى الفايروس التوارمي BK polyomavirus لدى هؤلاء المرضى. والى ارتفاع مستوى الخلايا التائية CD+8 مع حدوث الفايروس، وبالتالي فإن لها دور أساسي في قمع فايروس الورم الحليمي BK وإدارته. واستنادًا إلى الموقع التطوري للعينات السريرية التي تم فحصها بالنسبة للعينات الفيروسية الكويتية من المصل الرابع، أظهرت أمبليكونات VP1 تمايزًا حساسًا للغاية بين التسلسلات الفيروسية التي تم تحليلها. وفقا للدراسة، يمكن أن تكون أمبليكونات BK polyomavirus-VP1 بمثابة علامات للتمييز بين هذه العزلات الفيروسية المسببة للأمراض. لذا تؤكد هذه الدراسة أهمية التباين الوراثي

في فهم علم الأوبئة الجزيئي والديناميكيات التطورية لفيروس التوارمي BK polyomavirus ، والذي قد يؤثر على الإطار التطوري والتتبع الجغرافي للفيروس.