

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

CILVĒKA BOKAVĪRUSA PIRMĀ TIPĀ SASTOPAMĪBA
BĒRNIEM AR DZIĻO ELPCEĻU SLIMĪBĀM LATVIJĀ

Bakalaura darbs

Autors: Anda Vilmane
Stud. apl. Nr. av11174
Darba vadītājs: Maģ. biol. Santa Rasa

RĪGA 2014

KOPSAVILKUMS

Dziļo elpceļu slimības, ko var izraisīt vīrusu infekcija, ir biežs cēlonis bērnu saslimšanai pasaulē un Latvijā. Cilvēka bokavīrusa pirmais tips (HBoV1) ir viens no iespējamajiem infekciozajiem aģentiem, tomēr tā loma slimību izraisīšanā joprojām ir neskaidra.

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot HBoV1 iesaisti un sastopamību dziļā respiratorā trakta infekcijas gadījumā bērniem, kuri hospitalizēti ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.

Lietojot polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR), HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne konstatēta 33,33% pārbaudītajiem pacientiem.

Secinājums: HBoV1 varētu būt patogēns elpceļu slimību gadījumā, jo šī vīrusa genoma sekvenses klātbūtne, ko pavada augsta vīrusa slodze bez koinfekcijas ar citiem patogēniem, bieži konstatēta bērniem, kuri hospitalizēti ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.

Atslēgvārdi: HBoV1, dziļā respiratorā trakta infekcija, PĶR, reālā laika PĶR, RT-PĶR.

SUMMARY

Lower respiratory tract diseases, which can be caused by virus infection, is common cause of children morbidity around the world and in Latvia. Human bocavirus type one (HBoV1) is one of the possible infectious agents, though its role in causing the diseases is still unclear.

The aim of this study was to determine the involvement and frequency of HBoV1 in hospitalized children with acute lower respiratory tract infection.

Using polymerase chain reaction (PCR) HBoV1 genome sequence was found in 33.33% of analysed patients.

Conclusion: HBoV1 could be as a pathogen in respiratory tract diseases, due to the frequent detection of the virus genomic sequences, accompanied by a high viral load and absence of co-infections with other pathogens in hospitalized children with acute lower respiratory diseases.

Keywords: HBoV1, lower respiratory tract infection, PCR, real-time PCR, RT-PCR.

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ARTI – akūta respiratorā trakta infekcija

ARVI – akūta respiratora vīrusa infekcija

B19 – cilvēka parvovīruss B19

bp – bāzu pāri

BPV – liellopu parvovīruss

DNS – dezoksiribonukleīnskābe (*deoxyribonucleic acid – DNA*)

dNTP – dezoksiribonukleotīdfosfāts

HBoV – cilvēka bokavīruss

HBoV1 – cilvēka bokavīrusa pirmais tips

HBoV2 – cilvēka bokavīrusa otrais tips

HBoV3 – cilvēka bokavīrusa trešais tips

HBoV4 – cilvēka bokavīrusa ceturtais tips

hMPV – cilvēka metapneumovīruss

HSV – herpes simpleksa vīruss

kb – kilobāze

kDNS – komplementārā dezoksiribonukleīnskābe (*complementary deoxyribonucleic acid – cDNA*)

MgCl₂ – magnija hlorīds

mRNS – mesendžera ribonukleīnskābe (*messenger ribonucleic acid – mRNA*)

MVC – suņu parvovīruss

MVM – peļu minūtes vīruss

NFA – nazoarengiālais aspirāts (*nasopharyngeal aspirate – NPA*)

nm – nanometrs

NP1 – kodola fosfoproteīns 1

NS1 – nestrukturālais proteīns 1

ORF – atvērtas lasīšanas zonas (*open reading frame*)

PBMC – perifēro asiņu mononukleārās šūnas

PĶR – polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction – PCR*)

PPV – cūku parvovīruss

RNS – ribonukleīnskābe (*ribonucleic acid - RNA*)

rRNS – ribosomālā ribonukleīnskābe (*ribosomal ribonucleic acid – rRNA*)

RSV – respiratori sincitiālais vīruss

RT-PĶR – reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija (*reverse transcription polymerase chain reaction – RT-PCR*)

SD - standartnovirze

SDS – nātrija dodecilsulfāts

ssDNS – vienpavediena dezoksiribonukleīnskābe (*single stranded deoxyribonucleic acid – ssDNA*)

VP1 – vīrusa proteīns 1

VP2 – vīrusa proteīns 2

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Cilvēka bokavīrusa atklāšana.....	9
1.2. Cilvēka bokavīrusa taksonomija	9
1.3. Cilvēka bokavīrusa struktūra un genoms.....	10
1.4. Cilvēka bokavīrusa epidemioloģija	11
1.5. Cilvēka bokavīrusa saistība ar elpceļu slimībām	13
1.6. Cilvēka bokavīrusa saistība ar gastroenterītu	13
1.7. Cilvēka bokavīruss un koinfekcijas	14
1.8. Cilvēka bokavīrusa transmisija	15
2. METODIKA.....	16
2.1. Pacienti un paraugi.....	16
2.2. DNS sagatavošana un pārbaude.....	16
2.3. DNS izolēšana.....	17
2.4. RNS izolēšana.....	17
2.5. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana.....	18
2.6. kDNS sintezēšana	18
2.7. DNS un kDNS kvalitātes noteikšana	19
2.8. HBoV genoma sekvences noteikšana ar PĶR	20
2.10. Elektroforēze.....	21
2.11. Reālā laika PĶR.....	21
2.12. Materiāli.....	22
2.12.1. Reāģenti.....	22
2.12.2. Aprīkojums.....	24
3. REZULTĀTI	25
3.1. RNS elektroforētiska analīze	25
3.2. DNS un kDNS kvalitātes pārbaude	25
3.3. HBoV1 genoma sekvences sastopamība	26
3.4. Vīrusa slodzes noteikšana ar reālā laika PĶR	28
3.5. Klīniskais raksturojums pacientiem ar HBoV1 genoma sekvences klātbūtni organismā	29
4. DISKUSIJA	31
5. SECINĀJUMI	34
7. LITERATŪRAS SARAKSTS	36

IEVADS

Dziļo elpceļu slimības, ko bieži izraisa vīrusu infekcija, ir viens no galvenajiem iemesliem bērnu saslimšanai un mirstībai visā pasaulē. Amerikas Savienotajās Valstīs katru gadu aptuveni 30000 bērnu pirmā dzīves gada laikā tiek hospitalizēti ar dziļo elpceļu vīrusu infekciju. Jaunattīstības valstīs katru gadu apmēram 1,9 miljoni bērnu mirst no akūtas respiratorā trakta infekcijas (ARTI) (Hustedt and Vazquez 2010), kas ir aktuāla problēma arī Latvijas bērnu populācijā. Galvenie vīrusi, kurus saista ar dziļo elpceļu infekciju bērniem, ir respiratori sincitiālais vīruss (RSV), paragripas vīruss, adenovīruss un gripas vīruss. Pierādīts, ka koronavīruss un rinovīruss, ko uzskata par augšējo elpceļu infekcijas izraisītājiem, ir sastopami arī dziļo elpceļu infekcijas gadījumā. Turklāt tagad par iespējamajiem dziļo elpceļu infekcijas izraisītājiem bērniem tiek uzskatīti arī nesen atklātie cilvēka metapneimovīruss (hMPV) un cilvēka bokavīruss (HBoV) (Hustedt and Vazquez 2010).

HBoV ir jauns vīruss, kas atklāts 2005. gadā Zviedrijā koncentrētā rīkles aspirāta paraugā, kas ņemts no pacientiem ar akūtām elpceļu slimībām. Tas pieder pie *Parvoviridae* dzimtas, *Parvovirinae* apakšdzimtas un *Bocavirus* ģints. HBoV ir mazs vīruss bez apvalka, tam ir ikosaedriskas simetrijas kapsīds ar ~5,3 kb garu vienpavediena DNS genomu, kas satur trīs atvērtās lasīšanas zonas (ORF). Pirmās divas ORF kodē nestrukturālos proteīnus NS1 un NP1, bet trešā ORF kodē divus vīrusa kapsīda proteīnus VP1 un VP2 (Allander et al. 2005).

Ir izolētas četras dažādas HBoV sugas: HBoV1 primāri inficē elpceļu epitēliju un tiek saistīts ar elpceļu slimībām, bet HBoV2, HBoV3, HBoV4 primāri inficē kuņģa-zarnu traktu un galvenokārt atrod fēču paraugos. HBoV2 un HBoV3 tiek saistīti ar gastroenterītu (Jartti et al. 2012). Līdz šim pārlicinoši pierādījumi par HBoV asociāciju ar respiratorā trakta infekciju un akūtu gastroenterītu ir nepilnīgi. HBoV mēdz saistīt ar dažādām klīniskām izpausmēm: drudzi, klepu, rinoreju, sēkšanu, bronhiolītu, pneimoniju un gastroenterītu. Šī vīrusa sastopamība vidēji ir no 0,8 līdz 25% cilvēkiem populācijā kopumā (Li et al. 2013; Lüsebrink et al. 2009; Lee et al. 2007).

Izmantojot PĶR metodi, HBoV genoma sekvenci atrod dažādos paraugos: elpceļu uztriepju, fēču, seruma, mandeļu, siekalu, urīna, muguras smadzeņu šķidrums un pat upju ūdeņu un notekūdeņu paraugos (Mori et al. 2013; Jartti et al. 2012). Pētījumos ziņo par HBoV DNS konstatēšanu nazofarengiālo aspirātu (NFA), seruma, fēču un urīna paraugos, kas ņemti no pacientiem ar novājinātu imunitāti, un HBoV DNS sastopama pat asiņu paraugos (Renaud et al. 2011). Pretēji HBoV1, HBoV2-4 galvenokārt atrod cilvēka fēcēs, bet retos gadījumos - elpceļu sistēmā. Lai gan HBoV1 ir konstatēts visās vecuma grupās, tomēr pārsvarā to atrod bērniem ar elpceļu slimībām vecumā no sešiem līdz 24 mēnešiem ziemas un pavasara

mēnešos. Asins paraugu analizēšana un sasniegumi serodiagnostikā liecina, ka HBoV1 varētu būt elpceļu patogēns (Jartti et al. 2012).

Kopš pirmā ziņojuma par HBoV atradi, tā klātbūtni bērniem ar ARTI apraksta visā pasaulē vairāk nekā 200 publikācijās. Lielākajā daļā pētījumu analizē tikai HBoV izplatību, tādējādi saistība starp HBoV un elpceļu slimībām ir neskaidra. Daudzos pētījumos atklāj lielu HBoV koinfekciju skaitu, kas HBoV asociāciju ar slimībām padara vēl sarežģītāku (Schildgen et al. 2008). Publicētie pētījumi, kuros parāda HBoV klātbūtni ne tikai bērniem ar dziļā respiratorā trakta saslimšanu vai akūtu gastroenterītu, bet arī asimptomātiskiem bērniem, arī rada neskaidrību par vīrusa patogenitāti (Lüsebrink et al. 2009). Pētījumi par HBoV un tā četru sugu cirkulēšanu Latvijas populācijā līdz šim nav veikti, tādēļ Latvijā šis pētījums ir unikāls un tam ir būtiska nozīme.

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot HBoV1 iesaisti un sastopamību dziļā respiratorā trakta infekcijas gadījumā bērniem, kuri hospitalizēti ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Izolēt DNS no NFA, pilnām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, kā arī izolēt RNS no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām (PBMC) un sintezēt kDNS hospitalizētiem bērniem ar nezināmas izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.
2. Noteikt HBoV1 genoma secības klātbūtni izolētajā DNS un sintezētajā kDNS bērniem ar nezināmas izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.
3. Noteikt HBoV1 slodzi bērniem ar nezināmas izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.
4. Noteikt HBoV1 infekcijas saistību ar klīniskajām izpausmēm bērniem ar nezināmas izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cilvēka bokavīrusa atklāšana

Zinātnieks Tobias Allanders ar kolēģiem 2005. gadā Zviedrijā, Stokholmā atklāja cilvēka bokavīrusu. HBoV atrasts Karolinskas Universitātes laboratorijā, rīkles aspirātu paraugos no pacientiem ar akūtām elpceļu slimībām, kuri eksperimentā iekļauti pēc nejaušības principa. HBoV atklāts izmantojot inovatīvu molekulāro vīrusu skrīninga metodi, kas iekļauj piecus posmus: 1) enzimatiska un mehāniska saimniekorganisma DNS samazināšana, lai palielinātu vīrusu nukleīnskābes daudzumu, 2) iegūtās DNS amplifikācija ar „*random PCR*”, 3) PĶR produktu klonēšana, 4) klonu sekvencēšana, 5) sekvencēšanas rezultātu automatizēta rediģēšana un datubāžu meklēšana. Tehnoloģija piemērota, lai analizētu paraugus, kas iegūti no cilvēka elpceļiem. Eksperimentā atklāja septiņas vīrusu sugas, starp kurām bija arī parvovīruss, ko nosauca par HBoV1. Retrospektīvā pētījumā HBoV1 atklāts 17 no 567 (3,1%) pārbaudītajos paraugos, no kuriem 14 paraugos citi vīrusi netika atrasti, kas norāda uz HBoV1 kā infekciozo aģentu dziļo elpceļu slimībām bērniem (Allander et al. 2005).

Pāris gadus vēlāk, izmantojot šo pašu metodi, atklāja HBoV2-4. 2009. gadā zinātnieks J. L. Arthur ar kolēģiem atklāja HBoV2 un HBoV3, savukārt 2010. gadā zinātnieks A. Kapoor ar kolēģiem atklāja HBoV4. Šīs vīrusa sugas, atšķirībā no HBoV1, tika atrastas DNS, kas izolēta no fēcū paraugiem (Arthur et al. 2009; Kapoor et al. 2010).

1.2. Cilvēka bokavīrusa taksonomija

HBoV pieder pie *Parvoviridae* dzimtas, *Parvovirinae* apakšdzimtas un *Bocavirus* ģints (Schildgen et al. 2008). Balstoties uz HBoV genoma struktūras un aminoskābju secības līdzību ar liellopu parvovīrusu (BPV) un suņu parvovīrusu (MVC), kas arī pieder pie *Bocavirus* ģints, HBoV klasificē kā bokavīrusu (Allander et al. 2005). Izšķir četrus HBoV tipus: HBoV1, HBoV2, HBoV3 un HBoV4 (de Sousa et al. 2012). Pirms HBoV identificēšanas, cilvēka parvovīruss B19 (B19), kas pieder *Parvoviridae* dzimtai, *Parvovirinae* apakšdzimtai, *Erythrovirus* ģintij, bija vienīgais zināmais cilvēka patogēns parvovīrusu dzimtā. Bērniem B19 izraisa infekciozo eritēmu, bet pieaugušajiem B19 saista ar spontāno abortu, nedzimuša augļa nāvi, akūtu simetrisko poliartrofiju un vairākām autoimūnām slimībām (Lüsebrink et al. 2009).

1.3. Cilvēka bokavīrusa struktūra un genoms

Elektronu mikroskopija parāda, ka HBoV struktūra ir tipiska *Parvoviridae* ģintij, kas ir ikosaedriskas simetrijas bezapvalka kapsīds ar diametru ~25 nm (1. att.). HBoV genoms kodē nestrukturālo proteīnu NS1 un, bokavīrusiem unikālo, kodola fosfoproteīnu NP1, kā arī divas galvenās strukturālās olbaltumvielas VP1 un VP2 (Jartti et al. 2012). HBoV kapsīds sastāv no 60 strukturālo proteīnu kopijām (Gurda et al. 2010).

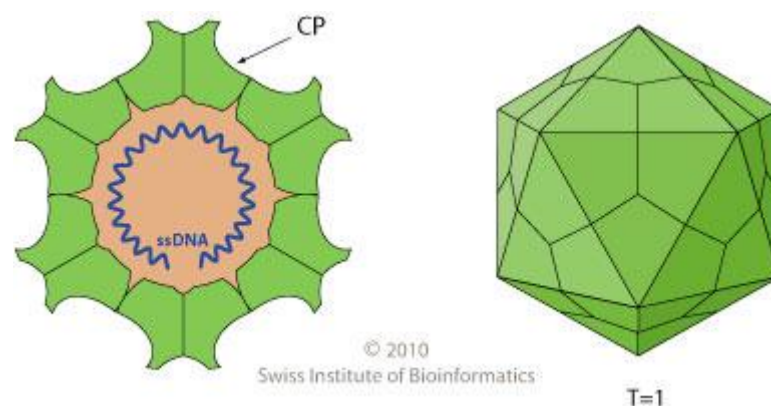
HBoV1 ir vienpavediena DNS (ssDNS) genoms, kas sastāv no 5543 nukleotīdiem, ar labās puses „matadatas” struktūru un kreisās puses „matadatas” struktūru (Tewary et al. 2013).

Pamatojoties uz pētījumiem par cilvēka parvovīrusu B19, VP2 vienības veido apmēram 95% no kapsīda (Ozawa et al. 1987). Atlikušos ~5% no kapsīda struktūras veido nelieli proteīni, kuru veids ir atkarīgs no vīrusu sugas. Visi satur nelielu daudzumu VP1 molekulu, bet dažas sugas, piemēram, peļu minūtes vīruss (MVM) un cūku parvovīruss (PPV), satur arī VP3, kas veidojas no VP2 proteolītiskās šķelšanās ceļā (Kerr 2006). Dažas HBoV1 VP2 molekulas, iespējams arī tiek sašķeltas, lai veidotu VP3 (Cecchini et al. 2009). Izpētīts, ka asins serumā sastopamo HBoV1 antivielu mērķa molekula ir vīrusa kapsīda olbaltumviela VP2 (Jartti et al. 2012).

Visi parvovīrusi kodē nestrukturālos proteīnus NS1, kam ir būtiska loma vīrusa replikācijā un vīrusa kapsīda veidošanā. NS1 varētu būt arī citas funkcijas, piemēram, šūnu cikla apstādīnāšanā, šūnu apoptozē, DNS bojājumu atbildes reakcijā, vīrusa un šūnu gēnu ekspresijas transaktivācijā un iedzīmtās imunitātes modulācijā. HBoV1 NS1 proteīns satur N-terminālo DNS saistīšanās/endonukleāzes domēnu, centrālo helikāzes domēnu un C-terminālo cinka pirksta domēnu (Tewary et al. 2013).

HBoV genoms, tāpat kā pārējiem *Bocavirus* ģints locekļiem, iever trīs atvērtās lasīšanas zonas (ORF). Pirmā ORF 5' galā kodē nestrukturālo proteīnu NS1. Nākamā ORF, kas ir unikāla HBoV, kodē otro nestrukturālo proteīnu NP1, kura funkcija nav zināma. Trešā ORF 3' galā kodē divus strukturālos vīrusa kapsīda proteīnus VP1 un VP2. HBoV vīrusa proteīniem ir 42% un 43% aminoskābju sekvenču identitāte ar atbilstošajiem lielopa parvovīrusa un suņu minūtes vīrusa proteīniem. HBoV2 un HBoV3 genoma proteīnu identitāte ar HBoV1 proteīniem ir attiecīgi: ~ 80 un 90% ar NS1, ~ 70 un 80% ar NP1, ~ 80 un 80% ar VP proteīniem (Gurda et al. 2010).

Lipīdu membrānas trūkums un vispārēji vienkāršā struktūra padara parvovīrusu kapsīdu ārkārtīgi izturīgu pret ārējās vides izmaiņām (Bräuniger et al. 2000).



1. attēls. Parvovīrusa struktūra.

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/567.html)

Figure 1. Structure of parvovirus.

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/567.html)

1.4. Cilvēka bokavīrusa epidemioloģija

HBoV1 atklāšana paraugos, kas ņemti no bērniem ar elpceļu slimībām, strauji veicināja papildus pētījumu veikšanu, lai noteiktu vīrusa klātbūtni elpceļu paraugos. Tā kā pārsvarā pētījumos paraugi tiek ņemti no simptomātiskiem pacientiem, bet tikai retos gadījumos arī no asimptomātiskiem indivīdiem, tad lielākā daļa pētījumu ir vērsti uz HBoV1 izplatību (Jartti et al. 2012).

HBoV1 izplatība pasaulē vidēji ir no diviem līdz 22% elpceļu uztriepju paraugos, kas ņemti no pacientiem ar akūtu elpceļu slimību, kas jaunāki par diviem gadiem (Li et al. 2013).

Ir veikti pētījumi, kuros HBoV1 infekcija, salīdzinoši augstā līmenī, konstatēta asimptomātiskiem bērniem. Pētījumā, kas veikts ASV, HBoV1 infekcija konstatēta 20 no 45 (44%) deguna uztriepju paraugos, kas ņemti no asimptomātiskiem pacientiem (Martin et al. 2010). J. Longtin ar kolēģiem savā pētījumā konstatē HBoV DNS 43 no 100 (43%) NFA, kas ņemti no bērniem, kuriem veikta plānota ķirurģiskā operācija (galvenokārt ausu, deguna un rīkles operācijas) un, slimnīcā stāšanās brīdī, pacientiem nav bijuši raksturīgie elpceļu slimību simptomi vai drudzis (Longtin et al. 2008).

HBoV1 klātbūtni konstatē arī fēču un urīna paraugos. F. Pozo ar kolēģiem HBoV1 DNS detektē urīna paraugos, kas ņemti no bērniem ar dziļā respiratorā trakta infekciju (Pozo et al. 2007). Kādā pētījumā Spānijā, HBoV1 DNS klātbūtni detektē fēču paraugos, kas ņemti no bērniem (jaunāki par trīs gadiem) ar gastroenterītu, turklāt šiem bērniem nav bijuši elpceļu infekciju simptomi (Vicente et al. 2007).

Izmantojot PĶR metodi, HBoV genoma secības klātbūtni detektē ne tikai paraugos, kas ņemti no elpceļiem un fēču paraugos, bet arī serumā, mandeļu un siekalu paraugos, kā arī upju ūdeņos un notekūdeņos (Jartti et al. 2012). Ir veikts pētījums, kurā HBoV1 un HBoV2 genoma secības atrod muguras smadzeņu šķidrums paraugos, kas ņemti no bērniem ar encefalītu (Mitu et al. 2012). V. Schildgen ar kolēģiem HBoV1 DNS klātbūtni konstatē plaušu audzēja un kolorektālā audzēja audu paraugos (Schildgen et al. 2013).

Saskaņā ar līdzšinējiem pētījumiem, HBoV1 infekcija ļoti bieži sastopama agrā bērnībā. Vertikālās antivielu nodošanas dēļ, HBoV seropozitivitāte ir izplatīta zīdaiņiem, kuri jaunāki par diviem mēnešiem, bet pēc tam tā samazinās. Atklāts, ka zems antivielu līmenis saglabājas bērniem no sešu līdz 12 mēnešu vecumam, pēc kura seropozitivitāte palielinās līdz sešu gadu vecumam, kad gandrīz visiem bērniem ir HBoV1 antivielas. Lielākajai daļai pieaugušo ir atrodamas antivielas pret HBoV1, ņemot vērā, ka tā ir bieži izplatīta infekcija (Jartti et al. 2012).

HBoV2, HBoV3, HBoV4 genoma secību klātbūtni galvenokārt atrod DNS, kas izolēta no fēcēm. HBoV2 un, iespējams, HBoV3 ir saistīti ar gastroenterītu. No šīm sugām, HBoV2 ir visizplatītākais ar biežumu līdz 26% cilvēkiem, kam seko HBoV3 (5%) un HBoV4 (2%). HBoV pieaugušajiem atrod retāk nekā bērniem, attiecīgi HBoV2 - 4%, HBoV3 - 1% un HBoV4 - 1% (Jartti et al. 2012). Trijos pētījumos HBoV2-4 atrod arī DNS paraugos, kas izolēti no elpceļu uztriepēm (Han et al. 2009; Song et al. 2010; Koseki et al. 2012).

Fēču paraugos HBoV3 konstatē retāk nekā HBoV2, bet HBoV3 biežums var pārsniegt HBoV1 biežumu. Somijā veiktā pētījumā, kurā iekļauti apmēram 900 bērni ar gastroenterītu, HBoV1-3 konstatē attiecīgi – 6%, 3% un 1% bērniem (Risku et al. 2012). Vēl plašākā pētījumā Lielbritānijā, kurā iekļauti 2256 pacienti ar gastroenterītu, HBoV1-3 konstatē attiecīgi – 3%, 22% un 7% gadījumos (Nawaz et al. 2012).

1.5. Cilvēka bokavīrusa saistība ar elpceļu slimībām

HBoV1 definē kā vienu no iespējamajiem akūtu elpceļu slimību izraisošiem aģentiem (Allander et al. 2005). Literatūras dati liecina, ka HBoV1 genoma sekvences klātbūtni lielākoties konstatē paraugos, kas iegūti no bērniem. Lüsebrink pētnieku grupa apkopojusi informāciju, ka biežākie klīniskie simptomi, ko saista ar HBoV1 ir sēkšana, drudzis, bronhiolīts un pneimonija. Ir dokumentēti arī gadījumi, kuros HBoV1 atrod bērniem bez raksturīgajiem simptomiem, tomēr šajos gadījumos HBoV1 koncentrācija paraugā ir salīdzinoši zema. J. Lüsebrink savā rakstā min piemēru, ka 17% bērniem ar ARTI, un 5% asimptomiskiem bērniem konstatē HBoV1 DNS klātbūtni paraugā (Lüsebrink et al. 2009).

X. Lu un līdzautori pauduši ideju, ka HBoV varētu būt atrodams mandeļu limfocītos un viņa pētījumā 32,2% limfocītu paraugos konstatēts HBoV (Lu et al. 2008).

Pētījumā, kas veikts Japānā, HBoV1 genoma secību atrod 18 no 318 (5,7%) elpceļu uztriepju paraugos, no pacientiem ar dziļo elpceļu infekciju. Pētījumā iekļautajiem pacientiem netika konstatēts cilvēka respiratori sincitiālais vīruss, gripas vīruss (A un B tips), kā arī cilvēka metapneimovīruss. Pacientu vecums, kuru paraugos atrod HBoV1 genoma sekvenci, ir no septiņiem mēnešiem līdz trīs gadiem un autori pauž ideju, ka bērnus līdz piecu mēnešu vecumam pret HBoV infekciju pasargā antivielas, ko iegūst no mātes (Ma et al. 2006). Tomēr pētījumā, kas veikts Saūda Arābijā, HBoV1 genoma secību konstatē divos paraugos, kas ņemti no divus un četrus mēnešus veciem bērniem. Tas norāda uz HBoV1 infekcijas iespējamību arī bērniem, kas jaunāki par pieciem mēnešiem (Abdel-Moneim et al. 2013).

Pašreizējās zināšanas par HBoV1 infekcijas gadījumiem liecina, ka dažkārt tas eksistē kā pasažieris, bet dažkārt kā patogēns ARTI gadījumā, turklāt diagnozi nevar balstīt tikai uz kvalitatīvas PĶR rezultātiem, kas iegūti, izmantojot elpceļu uztriepju paraugus. Zināms, ka daudzos pētījumos konstatē saistību starp elpceļu slimībām un augstu HBoV1 DNS kopiju skaitu, vai HBoV1 monoinfekciju paraugos (Debiaggi et al. 2012).

1.6. Cilvēka bokavīrusa saistība ar gastroenterītu

Ir zināms, ka *bocavirus* ģints vīrusi MVC un BPV izraisa kuņģa - zarnu trakta infekciju suņiem un teļiem. Lai gan vairākos pētījumos HBoV atrod fēču paraugos, kas iegūti no bērniem ar akūtām kuņģa - zarnu trakta slimībām, tomēr tā infekciozā loma ir neskaidra (Lüsebrink et al. 2009).

Kādā pētījumā Vācijā, HBoV genoma sekvenci atrod 14 no 307 (4,6%) DNS paraugos, kas izolēti no fēču paraugiem, bērniem ar gastroenterītu (Campe et al. 2008). Vairākos pētījumos ziņo par biežu HBoV koinfekcijas sastopamību vienlaicīgi ar citiem gastroenterītu izraisošiem vīrusiem, kas norāda, ka HBoV nav vienīgais gastroenterīta cēlonis bērniem (Cheng et al. 2008). J. I. Lee un līdzautori 2007. gadā ziņo par HBoV atradi astoņos no 962 (0,8%) DNS paraugos, kas izolēti no fēcēm, bērniem ar akūtu gastroenterītu. Pacientu vecums, kuriem atrod HBoV infekciju variē no septiņiem līdz 22 mēnešiem. Visiem astoņiem pacientiem kopīgā klīniskā pazīme ir caureja, pieciem pacientiem ir drudzis, trim vemšana un diviem - rinoreja un klepus (Lee et al. 2007). Kādā no jaunākajiem pētījumiem, kas veikts Čīlē, HBoV detektē 89 no 462 (19,3%) fēču paraugos, kas ievākti no bērniem (vecums - jaunāki par pieciem gadiem), kas hospitalizēti ar akūtu gastroenterītu. Klīnisko izmeklējumu laikā pacientiem netika konstatēti respiratorā trakta slimību simptomi un pētījumā iekļāva paraugus, kuros netika konstatēta rotavīrusa, kalicivīrusa, adenovīrusa un astrovīrusa klātbūtne (Levican et al. 2013).

S. Nawaz pētnieku grupa apšaubā HBoV kā infekciozo aģentu gastroenterīta gadījumā. Viņi savā pētījumā izolē DNS no 4380 fēču paraugiem (2256 paraugi no pacientiem ar gastroenterītu un 2124 paraugi no asimptomātiskas kontroles grupas). HBoV DNS detektē 149 (6,6%) paraugos no pacientiem ar gastroenterītu un 175 (8,2%) kontroles grupas paraugos. Tāpat HBoV koinfekciju ar citiem patogēniem konstatē 59,1% pacientiem ar gastroenterītu un 49,7% kontroles grupas indivīdiem (Nawaz et al. 2012).

1.7. Cilvēka bokavīruss un koinfekcijas

Pacientu DNS paraugos, kas satur HBoV genoma sekvenci, bieži konstatējama koinfekcija ar citiem patogēniem. DNS paraugos, kas ņemti no elpceļiem koinfekciju biežums var sasniegt 83% un DNS paraugos, kas ņemti no fēcēm līdz pat 100% (Jartti et al. 2012).

M. Debiaggi apkopojusi informāciju, ka HBoV infekcija bieži mēdz veidot koinfekciju ar citiem patogēniem, piemēram, rinovīrusu (HRV), adenovīrusu, respiratori sincitiālo vīrusu (RSV), kā arī ar baktērijām, piemēram, *Streptococcus spp* un *Mycoplasma pneumoniae*. HBoV bieži koinfekciju gadījumi liek apšaubīt HBoV kā patiesu patogēnu (Debiaggi et al. 2012).

Kādā pētījumā Kenijā, HBoV1 genoma sekvenca atrasta septiņos no 384 (1,8%) nazofarengiālo uztriepju paraugos, kas ņemti no bērniem ar augšējo elpceļu infekciju. DNS paraugos, kuros atrod HBoV1 genoma sekvenci, konstatēta koinfekcija ar citiem patogēniem:

ar paragripu 3, adenovīrusu, enterovīrusu un herpes simpleksa vīrusu (HSV) (Misigo et al. 2014).

Vicente et al. savā pētījumā 25 no 40 (62,5%) NFA DNS paraugos, kas ņemti no bērniem ar akūtu respiratorā trakta infekciju, atrod HBoV genoma sekvenci un konstatē koinfekciju ar citiem vīrusiem: ar respiratori sincitiālo vīrusu (13 paraugos), rinovīrusu (trijos paraugos), gripas A tipu (trijos paraugos), koronovīrusu OC43 (divos paraugos), adenovīrusu (vienā paraugā), gripas B tipu (vienā paraugā), respiratori sincitiālo vīrusu un koronovīrusu OC43 (vienā paraugā), gripas A tipu un rinovīrusu (vienā paraugā). Šajā pašā pētījumā 28 no 48 (58,3%) DNS paraugos, kas izolēti no fēcēm, kas ņemtas no bērniem ar gastroenterītu, konstatē koinfekciju ar citiem patogeniem: ar *Salmonella enteritidis* (vienā paraugā), *Campylobacter jejuni* (piecos paraugos), rotavīrusu (14 paraugos), noravīrusu (septiņos paraugos), *Campylobacter jejuni* un norovīrusu (vienā paraugā) (Vicente et al. 2007).

1.8. Cilvēka bokavīrusa transmisija

Cilvēka bokavīrusa transmisijas ceļš nav skaidri zināms, tomēr inficēšanās ar parvovīrusiem parasti notiek gaisa pilienu ceļā vai nonākot saskarsmē ar inficētām krēpām, fēcēm vai urīnu. Iespējams, ka HBoV1 arī izplatās šādā veidā, jo vīrusa DNS atrod dažāda bioloģiskā materiāla paraugos. Intrauterīnas inficēšanās iespējamība ir maz ticama, topošo māmiņu augstā imunitātes līmeņa dēļ (Jartti et al. 2012).

2. METODIKA

2.1. Pacienti un paraugi

Pētījums veikts atbilstoši drošības standartiem, ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju, kas izsniegta 2013. gada 30. maijā. Pirms izpētes visu pacientu vecāki deva rakstisku piekrišanu dalībai pētījumā.

Pētījumā iekļauti 33 bērni [22 (66,6%) vīrieši un 11 (33,3%) sievietes, vidējais vecums 22 (SD ±13) mēneši], kuri ievietoti VSIA Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas Infekcijas slimību klīnikā ar neskaidras izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju. Pētījumā iekļautajiem pacientiem noteiktas šādas klīniskās diagnozes: kreisās puses pneimonija, labās puses pneimonija, abpusēja pneimonija, akūts bronhīts, akūts laringīts, otīts, neprecizēta akūta elpceļu slimība, akūta respiratora vīrusa infekcija (ARVI), konjunktivīts, akūts obstruktīvs bronhīts, rinofaringīts un bronhiālā astma uzliesmojuma periodā. Visiem pacientiem, paraugu ņemšanas brīdī, bija drudzis ($T > 38^{\circ} C$). Sertificēts medicīnas personāls, atbilstoši standartizētam protokolam, no pacientiem paņēma perifēro asiņu un nazofarengiālo aspirātu (NFA) paraugus un nogādāja tos laboratorijā.

2.2. DNS sagatavošana un pārbaude

DNS izolēšanai izmantoja 500 μ l atkausētu pilno asiņu un 200 μ l no šūnām brīvas asins plazmas un 200 μ l NFA paraugus. Lai lizētu šūnas, asiņu un NFA paraugiem pievienoja vienu ml lizējošo buferi. Paraugus samaisīja un centrifugēja 10000 apgr./min. trīs min., lai šūnas nogulsnetu. Nocentrifugētajiem paraugiem noņēma supernatantu un nogulsnēm pievienoja proteināzes K buferi proteīnu šķelšanai (80 μ l asinīm un NFA, 100 μ l plazmai), 20% nātrija dodecilsulfāta (SDS) (20 μ l asinīm, 25 μ l plazmai un 35 μ l NFA), proteināzes K fermentu (15 μ l asinīm un plazmai un 20 μ l NFA) un 3x destilētu ūdeni līdz 0,5 ml atzīmei. Paraugus samaisīja un inkubēja vismaz četras stundas 55°C temperatūrā.

2.3. DNS izolēšana

DNS izolēšanai izmantoja fenola – hloroforma metodi. Paraugam pievienoja 0,5 ml fenola. DNS ekstrahēšanai paraugu 10 min. viegli maisīja, kam sekoja parauga centrifugēšana 10000 apgr./min. 10 min. Pēc centrifugēšanas supernatantu (ūdens/DNS fāzi) pārnesa jaunā stobriņā, tam pievienoja 250 µl fenola un 250 µl hloroforma, ekstrahēja 10 min. un centrifugēja 10000 apgr./min. 10 min. Supernatantu pārnesa jaunā stobriņā, kam pievienoja 0,5 ml hloroforma, paraugu ekstrahēja un centrifugēja tāpat, kā minēts iepriekš. Supernatantu pārnesa jaunā stobriņā, NFA un plazmas paraugam pievienoja 0,5 µl glikogēnu. DNS izgulsnēšanai pievienoja vienu ml ledusaukstu 96% etanolu un paraugu centrifugēja 14000 apgr./min. 15 min. +4°C temperatūrā. Pēc centrifugēšanas no stobriņa izlēja 96% etanolu, pievienoja vienu ml 70% etanolu un centrifugēja 14000 apgr./min. 15 min. +4°C temperatūrā. Pēc tam nolēja etanolu un paraugu žāvēja istabas temperatūrā. DNS šķīdināja, paraugam pievienojot molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni. Paraugu īslaicīgi glabāja +4°C temperatūrā, bet ilgstoši -20°C temperatūrā.

2.4. RNS izolēšana

RNS izolēšanai no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām (PBMC) izmantoja atsaldētas PBMC, kam pievienoja 500 µl Tri - Reāģenta šūnu lizēšanai. Paraugam pievienoja 200 µl hloroforma, maisīja 15 s un inkubēja 15 min. istabas temperatūrā. Tad paraugu centrifugēja 12000 g 15 min. +4° C temperatūrā, supernatantu pārnesa jaunā stobriņā un pievienoja 250 µl izopropanola. Paraugu samaisīja un inkubēja 10 min. istabas temperatūrā, centrifugēja 12000 g astoņas min. +4° C temperatūrā, pievienoja vienu ml 75% etanola, samaisīja un centrifugēja 7500 g piecas min. +4° C temperatūrā. Paraugam nolēja etanolu un žāvēja trīs līdz piecas min. istabas temperatūrā, tad RNS šķīdināja, pievienojot 30 µl DEPC ūdeni.

2.5. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana

DNS un RNS daudzuma noteikšanai paraugā izmantoja spektrofotometrijas metodi. DNS un RNS koncentrāciju mērija ar „*NanoDrop*” spektrofotometru, kas mēra šķidrums elektromagnētisko spraugumu. Lietojot programmu ND1000, noteica nukleīnskābes koncentrāciju 260 nm viļņu garumā. Iegūtos rezultātus izteica DNS un RNS ng/ μ l – nanogrami mikrolitrā. Iegūtās DNS un RNS tīrību parāda attiecība 260/280, kura tīrai DNS ir aptuveni 1,8, bet RNS - aptuveni 2,0.

2.6. kDNS sintezēšana

Komplementāro DNS (kDNS) sintezēja ar reversās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakciju (RT-PKĶR), izmantojot komerciāli pieejamu firmas *Thermo Scientific* kDNS sintēzes komplektu (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*). kDNS sintēzi veica atbilstoši ražotāja protokolam. Sterīlos, nukleāzes brīvos stobriņos, kas novietoti uz ledus, sekojošā secībā iepildīja:

- 0,1 ng – 5 μ g no kopējās RNS;
- 1 μ l oligo (dT)₁₈ praimeris;
- nukleāzes brīvu ūdeni (lai kopējais tilpums būtu 12 μ l).

Maisījumu viegli samaisīja, centrifugēja un inkubēja 65°C temperatūrā piecas min. Pēc inkubēšanas atdzesēja uz ledus. Tālāk paraugam pievienoja reaģentus sekojošā secībā:

- 4 μ l Reakcijas buferis (*5x Reaction Buffer*);
- 1 μ l RNāzes inhibitors (*RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ μ l)*);
- 2 μ l dNTP maisījums (*10 mM dNTP Mix*);
- 1 μ l Reversā transkriptāze (*RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μ l)*).

Paraugu samaisīja un centrifugēja. Lai sintezētu kDNS, paraugu inkubēja 42°C temperatūrā 60 min. Sintēzes reakciju apturēja paraugu karsējot 70°C temperatūrā piecas min. Īslaicīgi paraugu glabāja -20°C temperatūrā, bet ilgstoši glabāja -70°C temperatūrā.

2.7. DNS un kDNS kvalitātes noteikšana

kDNS parauga, kas izolēts no PBMC un DNS parauga, kas izolēts no pilnām asinīm vai no šūnām brīvas asins plazmas, vai NFA, kvalitāti noteica ar PĶR, nosakot β -globīna gēna sekvenču klātbūtni tajā. Par kvalitatīvu DNS, kas izolēta no pilnām asinīm vai NFA, uzskatīja, ja PĶR produktā konstatēta β -globīna gēna sekvenču klātbūtne ar izmēru 200 bp. Par kvalitatīvu DNS, kas izolēta no asins plazmas, uzskatīja, ja PĶR produktā netika konstatēta β -globīna gēna sekvenču klātbūtne, kas norāda uz to, ka nav notikusi kontaminācija ar šūnu piemaisījumiem. β -globīna gēna sekvenču klātbūtni noteica ar praimeriem:

GS268 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

GS269 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'

25 μ l PĶR amplifikācijas maisījuma pagatavošanai vienam paraugam izmantoja:

- 2,5 μ l 10x PĶR buferi;
- 2 μ l 25 mM MgCl₂;
- 0,5 μ l 10 mM dNTP;
- 0,1 μ l 100 μ M GS268 praimeris;
- 0,1 μ l 100 μ M GS269 praimeris;
- 0,1 μ l 5U/ μ l Taq polimerāzi;
- 17,7 μ l molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 2 μ l DNS parauga (300 ng/reakcijā).

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 3 min. 95°C;

Amplifikācija (40 cikli):

1. DNS denaturācija – 30 sek. 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 30 sek. 55°C;
3. DNS sintēze – 45 sek. 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 7 min. 72°C;

Uzglabāšana – +4°C.

2.8. HBoV genoma sekvences noteikšana ar PĶR

PĶR izmantoja HBoV specifiskas vīrusa genoma sekvences noteikšanai DNS, kas izolēta no šūnām brīvas asins plazmas, pilnām asinīm, vai NFA, un kDNS, kas sintezēta no RNS, kas izolēta no PBMC. Lai izvairītos no iespējamās kontaminācijas, izmantoja ūdens kontroli pēc katriem pieciem paraugiem. HBoV PĶR veica saskaņā ar T. P. Sloots et al. 2006.

HBoV NS1 gēna sekvences noteikšanu veica ar HBoV01.2. un HBoV02.2. praimeru komplektu, kas komplementāri NS1 gēnam, saskaņā ar T. P. Sloots et al. 2006.:

HBoV01.2. 5' – TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG – 3'

HBoV02.2. 5' – GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA – 3'

50 µl PĶR amplifikācijas maisījuma pagatavošanai vienam paraugam izmantoja:

- 5 µl 10x PĶR buferi;
- 3 µl 25 mM MgCl₂;
- 0,5 µl 10 mM dNTP;
- 0,2 µl 100 µM HBoV01.2. praimeru;
- 0,2 µl 100 µM HBoV02.2. praimeru;
- 0,2 µl 5U/µl Taq polimerāzi;
- 38,9 µl molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 2 µl DNS parauga (50 ng/reakcijā).

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 15 min. 95°C;

Amplifikācija (45 cikli):

1. DNS denaturācija – 20 s 94°C;
2. Praimeru hibridizācija – 20 s 56°C;
3. DNS sintēze – 30 s 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 15 min. 72°C;

Uzglabāšana – +4°C.

Par pozitīvo kontroli PĶR reakcijās izmantoja HBoV1 NS1 plazmīdu (dāvinājums no Prof. Hsin-Fu Liu) (Lin et. al. 2009). Amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gelā. Paredzamais PĶR produkta izmērs bija 300 bp.

2.10. Elektroforēze

Izolēto RNS un PĶR amplifikācijas produktus analizēja agarozes gēlā, izmantojot elektroforēzes metodi, lai sadalītu un identificētu DNS un RNS fragmentu.

Iegūto RNS analizēja elektroforētiski 1% agarozes gēlā, kura pagatavošanai izmantoja:

- 1 g agarozes pulveri;
- 100 ml 1x Gly buferi;
- 5 µl etīdija bromīdu.

Vienam līdz trīs µg RNS pievienojs 0,5 līdz trīs reizes vairāk *Glyoxal Load Gye* krāsu (atkarība no koncentrācijas) un DEPC ūdeni (lai kopējais tilpums būtu 10 µl), samaisīja un denaturēja 65°C 5 min. un vizualizēja gēlā.

PĶR amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gēlā, kura pagatavošanai izmantoja:

- 1,7 g agarozes pulveri;
- 100 ml 1 x TAE buferi;
- 5 µl etīdija bromīdu.

Piecus µl parauga iekrāsoja ar vienu µl 6x *Loading dye* krāsu un ar mikropipeti uznesa uz gēla. Lai noteiktu amplifikācijas produkta izmēru (bp), izmantoja marķieri pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23.

Iegūtos rezultātus vizualizēja, izmantojot iekārtu *BioSpectrum MultiSpectral Imaging System*.

2.11. Reālā laika PĶR

Prezīcai vīrusa daudzuma noteikšanai paraugā, izmantoja reālā laika PĶR metodi, lietojot firmas „*Genesig*” komerciāli pieejamu komplektu, atbilstoši ražotāja protokolam.

Reakcijas maisījuma pagatavošanai (15 µl) vienam paraugam izmantoja:

- 10 µl „*Oasing*” 2 x qPCR MasterMix, kuru pagatavoja atbilstoši protokolam;
- 1 µl HBoV praimera/zondes maisījums (*HBoV Primer/Probe mix*);
- 4 µl RNāzes/DNāzes brīvs ūdens (*RNAse/DNAse free water*).

Reakcijas maisījumam (15 µl) pievienoja piecus µl DNS parauga (25 ng/reakcijā).

Atbilstoši protokolam, pēc atšķaidījuma metodes, no pozitīvās kontroles pagatavoja sešus standartus:

- Standarts 1 (pozitīvā kontrole) – 10×10^5 kopijas/reakcijā;
- Standarts 2 – 10×10^4 kopijas/reakcijā;
- Standarts 3 – 10×10^3 kopijas/reakcijā;
- Standarts 4 – 10×10^2 kopijas/reakcijā;
- Standarts 5 – 100 kopijas/reakcijā;
- Standarts 6 – 10 kopijas/reakcijā.

Reakcijas apstākļi:

Enzīmu aktivācija – 15 min. 95°C;

Amplifikācija (50 cikli):

1. Denaturācija – 10 s 95°C;
2. Datu vākšana – 60 s 60°C.

2.12. Materiāli

2.12.1. Reāģenti

1. tabula
Reāģenti.
Table 1
Reagents.

Reāģents	Receptūra	Derīguma termiņš	Ražotājs	Ražotājvalsts
Lizējošais buferis (kopējais tilpums 50 ml)	0,5 ml 1M Tris HCl, pH 7,6	–	Sigma	ASV
	0,125 ml 2M MgCl ₂	–	–	–
	0,125 ml 4M NaCl	–	Sigma	ASV
	Destilēts H ₂ O	–	–	–
Proteināzes K buferis (kopējais tilpums 100 ml)	5,85 g NaCl	–	–	–
	23,98 ml 0,5M EDTA	–	Sigma	ASV
	Destilēts H ₂ O	–	–	–
<i>Deoxyribonuclease I</i> (<i>DNase I</i>)	–	–	Thermo Scientific	Lietuva

10x Taq buferis ar KCl	–	09.2015.	Thermo Scientific	Lietuva
25mM MgCl ₂	–	09.2015.	Thermo Scientific	Lietuva
0,2mM dNTP	–	06.2015.	Thermo Scientific	Lietuva
5U/μl Taq polimerāze DNA Taq Polymerase (recombinant)	–	09.2015.	Thermo Scientific	Lietuva
Agarozē – Top Vision LE GQ Agarose	–	–	Thermo Scientific	Lietuva
1x Gly elektroforēzes buferis (1L)	10 ml 10x NorthernMax® Gly Gel Prep/Running Buffer	–	Ambion	ASV
	990 ml destilēts ūdens	–	–	–
Etīdija bromīds – 1%, 10 mg/ml	–	–	Appllichem	Vācija
50x TAE elektroforēzes buferis	40 mM Tris	08.2014.	Thermo Scientific	Lietuva
	20 mM acetic acid			
	1 mM EDTA(20 ml 50x TAE, 980 ml destilēts H ₂ O)			
6x Loading Dye Solution	10 mM Tris – HCl (pH 7,6) 0,03% Bromophenol blue	+4°C – 12 mēn. pēc atvēršanas	Thermo Scientific	Lietuva
	0,03% xylene cyanol FF			
	60% glycerol 60 mM EDTA			
Elektroforēzes marķieris – 1 μl pUC19DNA/MspI (HpaII) Marker, 23	1 μl pUC19DNA/MspI (HpaII) Marker, 23	–	Thermo Scientific	Lietuva
	1 μl 6x Loading Dye Solution			
	4 μl destilēts H ₂ O			
Proteināze K ferments	–	11.2015.	Thermo Scientific	Lietuva
Glikogēns – 20 mg/ml	–	–	Thermo Scientific	Lietuva
Fenols, pH 8,0	–	9 mēn. pēc atvēršanas	USB Corporation	ASV

Hloroforms	–	3 gadus pēc atvēršanas	Fisher Scientific	Lielbritānija
SDS šķīdums 20%	–	–	BIORAD	ASV
Praimeri	–	–	Integrated DNA Technologies	ASV
DEPC – Treated Water	–	–	Ambion	ASV
Izopropanols	–	–	Sigma-Aldrich	ASV
Tri-Reaģents	–	–	Sigma	Vācija
<i>Glyoxal Load Dye</i> krāsa	–	–	Ambion	ASV
Molekulārās bioloģijas tīrības ūdens	–	–	Sigma	Vācija
96% etanols	–	–	Enola SIA	Latvija

2.12.2 Aprīkojums

Amplifikators: BIOMETRA, Thermocyclex, Vācija

Analītiskie sviri: Kern, Vācija

Aparatūra rezultātu vizualizēšanai: BioSpectrum MultiSpectral Imaging System, UVP, Lielbritānija

Centrifūga: Mikro 22r, Hettich, Vācija

Centrifūga: Mini Spin “Eppendorf”, Vācija

Elektroforēzes tanks: Multi Sub Electrophoresis Systems, Cleaver Scientific Ltd, Lielbritānija

Gumijas cimdi, dažāda veida stikla kolbas, petri plates, pincetes, šķēres, marķieri

Inkubators: „MEMMERT”, Vācija

Līdzstrāvas avots: Biometra Power Pack P25 T, Vācija

Maisītājs: Vortex Sankine 10897, Latvija

Mikroviļņu krāsns: M1712R, SAMSUNG, Koreja

Pipetes: Finnpipette F2, Thermo Scientific, Somija

Reakciju stobriņi 0,5 ml, 1,5 ml un 2 ml, uzgaļi ar filtru, uzgaļi bez filtra: Thermo Labsystems, Somija

Reālā laika PQR aparatūra: 7500 Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, ASV

Spektrofotometrs: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, ASV

UV transiluminators: Biometra TI2, Vācija

3. REZULTĀTI

3.1. RNS elektroforētiska analīze

Izolētās RNS kvalitāti analizēja elektroforētiski 1% agarozes gēlā. 2. attēlā redzama mesendžera RNS (mRNS) un ribosomālā RNS (rRNS).



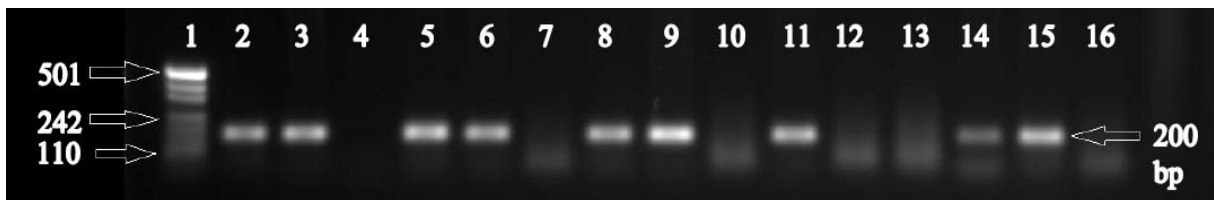
2. attēls. Izolētās RNS elektroforētiska analīze 1% agarozes gēlā. 1. – 5. mRNS un rRNS joslas no kopējās RNS paraugiem.

Figure 2. Isolated RNA electrophoretic analysis in 1% agarose gel. 1. – 5. mRNA and rRNA bands from total RNA samples.

3.2. DNS un kDNS kvalitātes pārbaude

Izolētās DNS paraugu kvalitāti pārbaudīja ar PĶR, nosakot β -globīna gēna sekvences klātbūtni no NFA, pilnām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas izolētajos DNS paraugos. Arī no PBMC iegūtas kDNS paraugu kvalitāti pārbaudīja ar PĶR, nosakot β -globīna gēna sekvences klātbūtni. 3. attēlā redzams, ka pozitīvās kontroles un iegūtā amplifikācijas produkta izmērs ir 200 bp.

No pilnām asinīm un NFA izolētajā DNS un no PBMC iegūtajā kDNS konstatēja β -globīna gēna sekvences klātbūtni, bet no šūnām brīvas asins plazmas izolētajā DNS β -globīna gēna sekvenci neatrada, kas liecina par to, ka izolētā DNS un kDNS ir kvalitatīva un lietojama tālākiem pētījumiem.

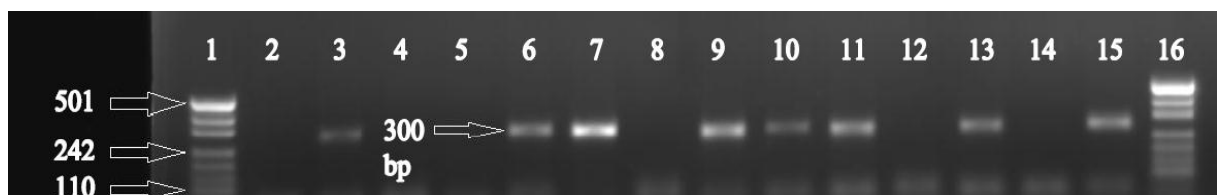


3. attēls. β - globīna gēna amplifikācijas produkta elektroforētiska analīze 1,7% agarozes gēlā. 1. Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2.,3.,5. NFA DNS paraugi, kas satur β -globīna gēna sekvenci; 4. Reaģentu ūdens kontrole; 6.,8.,9. Pilnu asiņu DNS paraugi, kas satur β -globīna gēna sekvenci; 7.,10.,12.,13. No šūnām brīvas asins plazmas DNS paraugi, kas nesatur β -globīna gēna sekvenci; 11.,14. kDNS paraugi, kas satur β -globīna gēna sekvenci; 15. Pozitīvā kontrole; 16. Negatīvā kontrole.

Figure 3. Electrophoretic analysis of β -globin gene amplification product in 1.7% agarose gel. 1. Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2.,3.,5. NFA DNA samples with β -globin gene sequence; 4. Reagent water control; 6.,8.,9. Whole blood DNA samples with β -globin gene sequence; 7.,10.,12.,13. From cells free blood plasma DNA samples without β -globin gene sequence; 11.,14. cDNA samples with β -globin gene sequence; 15. Positive control; 16. Negative control.

3.3. HBoV1 genoma sekvences sastopamība

Izmantojot praimeru komplektu HBoV01.02. un HBoV02.02., NS1 gēna sekvences klātbūtni noteica DNS paraugos, kas izolēti no NFA, pilnām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, kā arī kDNS paraugos, kas sintezēti no RNS, kas izolēta no PBMC. 5. attēlā redzams, ka pozitīvās kontroles un iegūtā amplifikācijas produkta izmērs ir 300 bp.

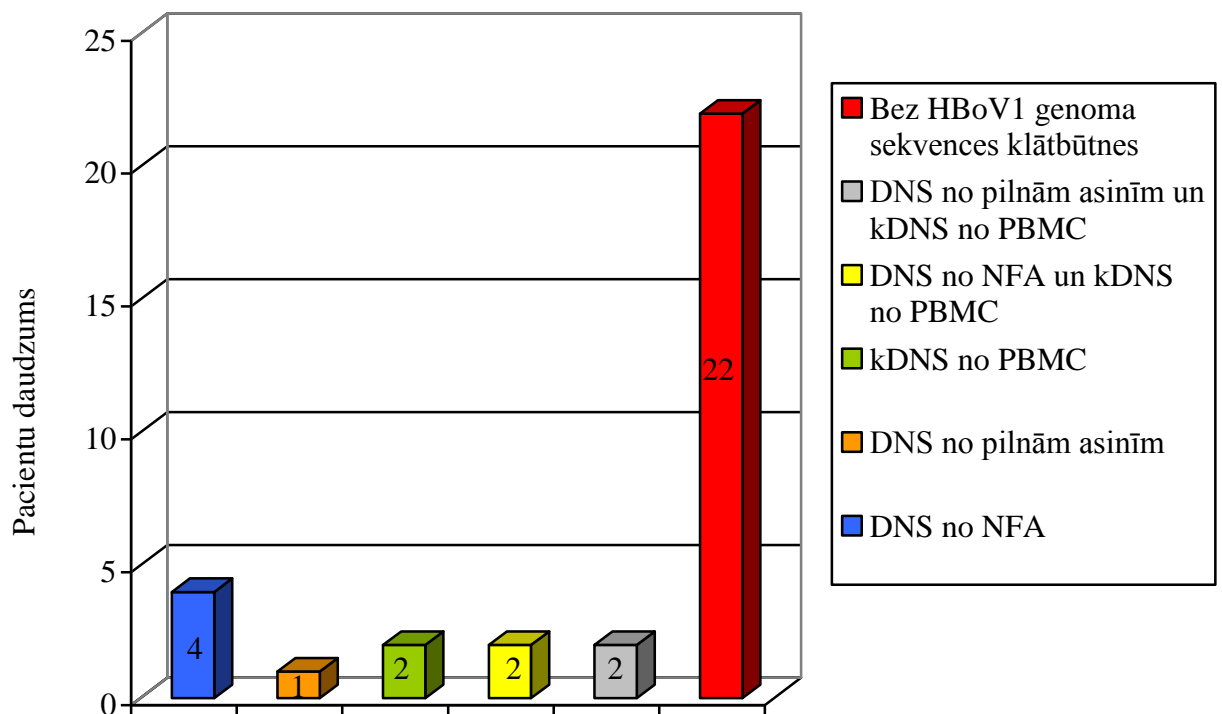


5. attēls. HBoV specifiska NS1 gēna sekvences amplifikācijas produkta elektroforētiska analīze 1,7% agarozes gēlā. 1.,16. Marķieris [pUC19DNA/MspII(HpaII)]; 2. NFA DNS paraugs, kas nesatur NS1 gēna sekvenci; 3.,7.,9. NFA DNS paraugi, kas satur NS1 gēna sekvenci; 4. Pilnu asiņu DNS paraugs, kas nesatur NS1 gēna sekvenci; 5. No šūnām brīvas asins plazmas DNS paraugs, kas nesatur NS1 gēna sekvenci; 6.,11. Pilnu asiņu DNS paraugi, kas satur NS1 gēna sekvenci; 8. Reāģentu ūdens kontrole; 10.,13. kDNS paraugi, kas satur NS1 gēna sekvenci; 12. kDNS paraugs, kas nesatur NS1 gēna sekvenci; 14. Negatīvā kontrole; 15. Pozitīvā kontrole.

Figure 5. Electrophoretic analysis of HBoV specific NS1 gene sequence amplification product in 1.7% agarose gel. 1.,16. Marker [pUC19DNA/MspII(HpaII)]; 2. NPA DNA sample without NS1 gene sequence; 3.,7.,9. NPA DNA samples with NS1 gene sequence; 4. Whole blood DNA sample without NS1 gene sequence; 5. From cells free blood plasma DNA sample without NS1 gene sequence; 6.,11. Whole blood DNA samples with NS1 gene sequence; 8. Reagent water control; 10.,13. cDNA samples with NS1 gene sequence; 12. cDNA sample without NS1 gene sequence; 14. Negative control; 15. Positive control.

HBoV1 genoma sekvences klātbūtni konstatēja 11 no 33 (33,33%) pacientiem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju, no tiem piecām (45,45%) sievietēm un sešiem (54,54%) vīriešiem. Četriem no 11 pacientiem HBoV1 genoma sekvences klātbūtni konstatēja DNS, kas izolēta no NFA paraugiem, bet vienam no 11 pacientam - no pilnām asinīm izolētā DNS. Diviem no 11 pacientiem HBoV1 genoma sekvenci konstatēja kDNS paraugos, kas sintezēti no PBMC izolētas RNS. Diviem no 11 pacientiem HBoV1 genoma sekvences klātbūtni detektēja gan no NFA izolētā DNS paraugā, gan kDNS paraugā un diviem HBoV1 genoma sekvences klātbūtni detektēja gan no pilnām asinīm izolētajā DNS, gan kDNS paraugā (6. att.). Nevienam no pacientiem HBoV1 genoma sekvences klātbūtni neatrada DNS paraugos, kas izolēti no šūnām brīvas asins plazmas.

Sekvenējot iegūtos PĶR produktus, noteica piederību HBoV1 celmam AR2010_2436 ar numuru KC544965.1.



6. attēls. HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne pacientiem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju.

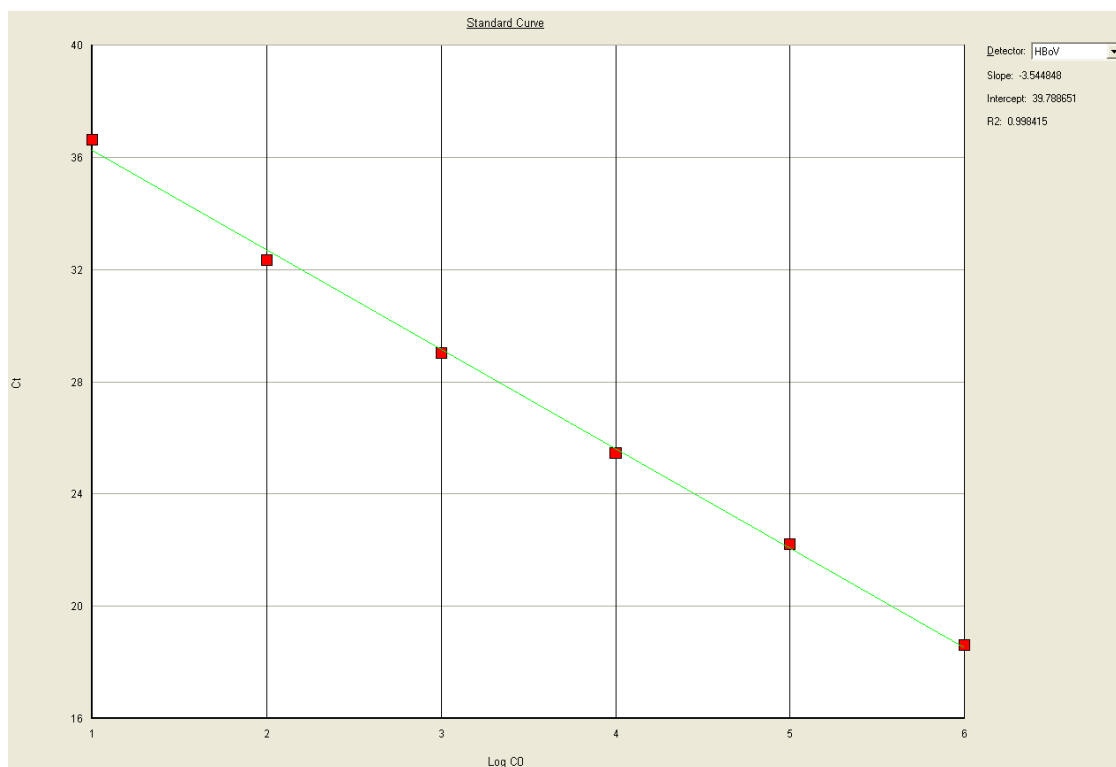
Figure 6. Presence of HBoV1 genomic sequences in patients with acute lower respiratory tract infection.

3.5. HBoV slodze pacientiem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju

DNS paraugos, kuros konstatēja HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni, noteica vīrusa slodzi, izmantojot reālā laika PĶR metodi. Par to, ka reālā laika PĶR notikusi veiksmīgi un iegūtie rezultāti ir izmantojami analizēšanai, liecina standartlīkne un ideālā gadījumā tās koeficients R^2 ir tuvu 1,0.

Grafikā (7. att.) redzams standartlīknes piemērs, kurā standartiem nav būtiskas nobīdes no taisnes, kas liecina, ka reakcija veikta precīzi. Vidējā HBoV slodze paraugos bija 264415,62 kopijas/miljons šūnās (no 4,27 līdz 3254718.133 kopijas/miljons šūnās).

DNS paraugos, kas izolēti no NFA, vīrusa slodze bija no <10 līdz 3254718,1 kopijām/miljons šūnās, bet no pilnām asinīm izolētā DNS, vīrusa slodze bija no <10 līdz 277,03 kopijām/miljons šūnās. Turklāt, kDNS paraugos, kas iegūti no PBMC, vīrusa slodze bija no 4,27 līdz 20,55 kopijām/miljons šūnās.



7. attēls. Reālā laika PQR standartlīkne.

Figure 7. Real – time PCR standard curve.

3.6. Klīniskais raksturojums pacientiem ar HBoV1 infekciju

Vienam pacientam, kuram konstatēta RSV klātbūtne organismā, HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne DNS paraugā netika detektēta. Visiem 11 (100%) pacientiem, kuriem konstatēja HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni DNS paraugos bija klepus, četriem (36,36%) pacientiem bija iesnas, vienam pacientam bija sāpes ausīs, diviem pacientiem bija apgrūtināta

elpošana, pieciem (45,45%) bija sēkšana, četriem (36,36%) pacientiem bija troksņi un vienam pacientam – febrila temperatūra. Viens no pacientiem, kuram konstatēja HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni bija vecumā līdz 10 mēnešiem, trīs pacienti – vecumā no 11 līdz 20 mēnešiem, pieci pacienti – no 21 līdz 30 mēnešiem un divi pacienti – vecāki par 31 mēnesi. Trīs pacientiem, kuriem konstatēja HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni DNS paraugos, bija noteikta klīniskā diagnoze – kreisās puses pneimonija, pieciem – labās puses pneimonija, diviem – abpusēja pneimonija un vienam – bronhiālā astma uzliesmojuma periodā kopā ar ARVI un rinofaringītu.

4. DISKUSIJA

Lai gan HBoV1 atklāja tikai 2005. gadā Zviedrijā (Allander et al. 2005), līdz šim pasaulē jau ir veikti daudzi pētījumi par šī vīrusa sastopamību bērniem ar akūtu respiratorā trakta infekciju (Abdel-Moneim et al. 2013; Corral et al. 2011; Ghietto et al. 2012; Misigo et al. 2014; Zaghoul 2011).

Šajā pētījumā, izmantojot PĶR, noteikta HBoV1 NS1 gēna sekvenču klātbūtne DNS, kas izolēta no NFA, pilnām asinīm, no šūnām brīvas asins plazmas un kDNS, kas iegūta no PBMC bērniem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju. Pētījumā iekļauti pacienti vecumā no diviem līdz 50 mēnešiem ar nezināmas izcelsmes dziļā respiratorā trakta infekciju.

Vairums pētījumos HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni konstatē no diviem līdz 22% bērniem līdz divu gadu vecumam ar respiratorā trakta infekciju (Li et al. 2013). Šādu rezultātu savā pētījumā iegūst, piemēram, zinātniece M. Z. Zaghoul, kura 2011. gadā HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni konstatē 22 no 100 (22%) bērniem ar elpceļu infekciju (Zaghoul 2011). Tāpat arī citos pētījumos HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni atrod no diviem līdz 22% bērniem ar respiratorā trakta infekciju (Ghietto et al. 2011; Haidopoulou et al. 2010; Manning et al. 2006).

Šajā pētījumā HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni bērniem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju konstatē 11 no 33 (33,33%) gadījumos, kas ir biežāk nekā vidēji pasaulē. Tas, iespējams, skaidrojams ar faktu, ka vairumā pētījumos HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni meklē DNS, kas izolēta tikai no NFA, tomēr šajā pētījumā iekļauta HBoV1 genoma sekvenču noteikšana arī DNS, kas izolēta no pilnām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, un kDNS, kas iegūta no PBMC. Taču ir publicēti arī ziņojumi, kuru rezultāti sakrīt ar šī pētījuma rezultātiem. Vienā no tiem HBoV1 genoma sekvenču salīdzinoši bieži atrod bērniem ar elpceļu slimībām - 106 no 318 (33%) DNS paraugiem, kas izolēti no deguna uztriepēm (Martin et al. 2010).

Atrodami literatūras avoti, kuros autori pauž ideju, ka bērnus līdz piecu mēnešu vecumam no HBoV infekcijas pasargā antivielas, kuras iegūtas no mātes (Ma et al. 2006), taču citā pētījumā HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni konstatē arī bērniem, kas jaunāki par pieciem mēnešiem (Abdel-Moneim et al. 2013). Arī šajā pētījumā, HBoV1 genoma sekvenču atrod divus mēnešus vecam bērnam, kas liek apšaubīt šo hipotēzi par antivielu pret HBoV pārnesi no mātes grūtniecības laikā.

Veiktajā pētījumā bija iekļauta HBoV1 genoma sekvenses noteikšana arī kDNS, kas citos pētījumos ir veikta reti. Šajā pētījumā sešiem no 33 (18,18%) pacientiem, HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni atrod kDNS paraugos, kas sintezēti no RNS, kas izolēta no PBMC. Tas norāda uz agrīnu vīrusa replikāciju organismā, jo, DNS vīruss veido mRNS, lai varētu replicēties saimniekorganisma šūnās (<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>). Pieciem no šiem pacientiem bija labās puses, kreisās puses vai abpusēja pneimonija. W. Zhou, balstoties uz sava pētījuma rezultātiem, pauž ideju, ka HBoV varētu būt viens no pneimoniju izraisošiem aģentiem bērniem Ķīnā (Zhou et al. 2013). Šajā pētījumā četriem no 33 (12,12%) pacientiem, HBoV1 genoma sekveni atrod tikai DNS, kas izolēta no NFA paraugiem. A. Christensen izsaka varbūtību, ka, gadījumos, kad HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni konstatē DNS paraugos, kas izolēti no NFA, bet nekonstatē RNS transkripciju, HBoV1 infekcija varētu būt pārciesta un organismā saglabājusies vīrusa DNS, ka arī, ka šādā gadījumā HBoV1 infekcija ir latentā (A. Christensen et al. 2013).

Vīrusa klātbūtne DNS paraugos, kas izolēti no šūnām brīvas asins plazmas, liecina par aktīvu vīrusa infekciju vai virēmiju, taču šajā pētījumā HBoV1 genoma sekveni neatrod DNS paraugos, kas izolēti no šūnām brīvas asins plazmas.

Šajā pētījumā iekļautajiem pacientiem, kuriem konstatē HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni, noteiktie klīniskie simptomi sakrīt ar citos pētījumos minētajiem. Piemēram, Ķīnā veiktā pētījumā, bērniem, kuriem konstatē HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni, arī izpaužas sekojoši klīniskie simptomi: klepus, sēkšana un drudzis (Hao et al. 2013).

Ar reālā laika PQR noteica HBoV1 slodzi DNS un kDNS paraugos, kuros konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne. Bērniem ar akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju HBoV slodze ir no 4,27 līdz 3254718,1 kopijām/miljons šūnās. Izteikti augstu šī vīrusa slodzi detektē DNS, kas izolēta no NFA paraugiem - 181900,95 kopijas/miljons šūnās un 3254718,1 kopijas/miljons šūnās. Vienam no šiem pacientiem noteikta klīniskā diagnoze – kreisās puses pneimonija un otram – labās puses pneimonija. Augsta vīrusa slodze DNS paraugā arī liecina par aktīvu vīrusa infekciju organismā. Veikti pētījumi, kuros arī ziņo par augstu HBoV1 slodzi pacientiem ar elpceļu slimībām. Y. Deng ar kolēģiem savā pētījumā detektē vidēji 9912 kopijas/ mL NFA (<500 līdz 1×10^9 kopijas/mL NFA) vīrusa slodzi DNS no NFA paraugiem, kas ņemti no bērniem ar akūtu elpceļu infekciju (Deng et al. 2012). Citā pētījumā augsta HBoV1 slodze (vidēji $5,1 \times 10^6$ kopijas/mL) detektēta DNS paraugos, kas izolēti no NFA stacionētiem pacientiem ar dziļā respiratorā trakta infekciju. Autori konstatē, ka lielāka vīrusa slodze ir HBoV1 monoinfekcijas gadījumā, nekā koinfekcijas gadījumā, kā arī lielāka HBoV1 slodze ir pacientiem ar respiratorā trakta slimību smagākā stadijā (Zhao et al. 2013). Zinātnieka B. Zhao iegūtie rezultāti ir pretrunā ar šajā pētījumā iegūtajiem datiem, jo viņš

savā pētījumā konstatē arī HBoV1 koinfekcijas gadījumus, savukārt šajā pētījumā atrasti tikai HBoV1 monoinfekcijas gadījumi. Fakts, ka šajā pētījumā iekļautajiem bērniem netiek konstatēta koinfekcija ar citiem patogēniem, norāda, ka HBoV1 var nebūt kofaktors akūtas dziļā respiratorā trakta infekcijas gadījumā.

5. SECINĀJUMI

HBoV1 varētu būt patogēns akūtas dziļā respiratorā trakta infekcijas gadījumā, jo šī vīrusa genoma sekvenču klātbūtne, ko pavada augsta vīrusa slodze bez koinfekcijas ar citiem patogēniem, bieži konstatēta bērniem, kuri hospitalizēti ar nezināmas izcelsmes akūtu dziļā respiratorā trakta infekciju. Tomēr, lai spriestu pārliecinoši, nepieciešams veikt plašāku pētījumu, kurā analizētu arī asimptomātisku bērnu grupu, lai noteiktu vai HBoV1 ir patogēns, vai kofaktors akūta respiratorā trakta slimību gadījumā un spriestu par tā saistību ar šīm slimībām.

6. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta asistenta p.i. Maģ. biol. Santai Rasai par darba vadīšanu, palīdzību praktisko iemaņu iegūšanā laboratorijā un darba izstrādāšanā;

RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta Onkovirusoloģijas laboratorijas direktorei Asoc. prof. Modrai Murovscai par iespēju izstrādāt bakalaura darbu;

Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas ārstei-rezidentei Ingai Ziemelei par bioloģiskā materiāla nodrošināšanu.

Paldies Dr. med. Vairai Saulītei par darba recenzēšanu.

Pētījums veikts Rīgas Stradiņa universitātes iekšējā zinātniskā projekta „Cilvēka bokavīrusa (HBoV) tipu epidemioloģija, patogenitāte un iespējamā asociācija ar dziļo elpceļu slimībām un akūtu gastroenterītu bērniem” ietvaros. Projekta Nr. RSU ZP 17/2013.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdel-Moneim A. S., Kamel M. M., Al-Ghamdi A. S., Al-Malky M. I. R. 2013. Detection of Bocavirus in Children Suffering from Acute Respiratory Tract Infections in Saudi Arabia. – PLoS One, 8 (1): e55500.
2. Allander T., Tammi M. T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Anderson B. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (36): 12891-12896.
3. Arthur J. L., Higgins G. D., Davidson G. P., Givney R. C., Ratcliff R. M. 2009. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. – PLoS Pathogens, 5 (4): e1000391.
4. Bräuniger S., Peters J., Borchers U., Kao M. 2000. Further studies on thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat. – International Journal of Hygiene and Environmental Health, 203 (1): 71 –75.
5. Campe H., Hartberger C., Sing A. 2008. Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. – Journal of Clinical Virology, 43 (3): 340-342.
6. Cecchini S., Negrete A., Virag T., Graham B. S., Cohen J. I., Kotin R. M. 2009. Evidence of Prior Exposure to Human Bocavirus as Determined by a Retrospective Serological Study of 404 Serum Samples from Adults in the United States. – Clinical and Vaccine Immunology, 16 (5): 597 – 604.
7. Cheng W. X., Jin Y., Duan Z. J., Xu Z. Q., Qi H. M., Zhang Q., Yu J. M., Zhu L., Jin M., Liu N., Cui S. X., Li H. Y., Fang Z. Y. 2008. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. – Clinical Infectious Diseases, 47 (2): 161-167.
8. Christensen A., Dollner H., Skanke L. H., Krokstad S., Moe N., Nordbo S. A. 2013. Detection of Spliced mRNA from Human Bocavirus 1 in Clinical Samples from Children with Respiratory Tract Infections. – Emerging Infectious Diseases, 19 (4): 574 – 580.
9. Debiaggi M., Canducci F., Ceresola E. R., Clementi M. 2012. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. – Virology Journal, 9: 247.
10. Deng Y., Gu X., Zhao X., Luo J., Luo Z., Wang L., Fu Z., Yang X., Liu E. 2012. High Viral Load of Human Bocavirus Correlates with Duration of Wheezing in Children with Severe Lower Respiratory Tract Infection. – PLoS One, 7 (3): e34353.
11. Ghiotto L. M., Camara A., Zhou Y., Pedranti M., Ferreyra S., Frey T., Camara J., Adamo M. P. 2012. High prevalence of human bocavirus 1 in infants with lower acute

respiratory tract disease in Argentina, 2007-2009. – *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (1): 38 – 40.

12. Gurda B. L., Parent K. N., Bladdek H., Sinkovits R. S., DiMattia M. A., Rence C., Castro A., McKenna R., Olson N., Brown K., Baker T. S., Agbandje-McKenna M. 2010. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. – *Journal of Virology*, 84 (12): 5880 – 5889.

13. Haidopoulou K., Goutaki M., Damianidou L., Eboriadou M., Antoniadis A., Papa A. 2010. Human bocavirus infections in hospitalized Greek children. – *Archives of Medical Science*, 6 (1): 100-103.

14. Han T. H., Chung J. Y., Hwang E. S. 2009. Human bocavirus 2 in children, South Korea. – *Emerging Infectious Diseases*, 15 (10): 1698-1700.

15. Hao R., Ni K., Xia Q., Peng C., Deng Y., Zhao X., Fu Z., Liu W., Liu E. 2013. Correlation between nucleotide mutation and viral loads of human bocavirus 1 in hospitalized children with respiratory tract infection. - *Journal of General Virology*, 94 (Pt 5): 1079 – 1085.

16. Hustedt J. W., Vazquez M. 2010. The changing face of pediatric respiratory tract infections: how human metapneumovirus and human bocavirus fit into the overall etiology of respiratory tract infections in young children. – *Yale Journal of Biology and Medicine*, 83 (4): 193 – 200.

17. Jartti T., Hedman K., Jartti L., Ruuskanen O., Allander T., Söderlund-Venermo M. 2012. Human bocavirus – the first 5 years. – *Reviews in Medical Virology*, (22): 46-64.

18. Kapoor A., Simmonds P., Slikas E., Li L., Bodhidatta L., Sethabutr O., Triki H., Bahri O., Oderinde B. S., Baba M. M., Bukbuk D. N., Besser J., Bartkus J., Delwart E. 2010. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. – *The Journal of Infectious Diseases*, 201 (11): 1633 – 1643.

19. Kerr J. R., Cotmore S. F., Bloom M. E., Linden M. R., Parrish C., editors. *Parvoviruses*. Boca Raton: Hodder Arnold; 2006.

20. Koseki N., Teramoto S., Kaiho M., Gomi-Endo R., Yoshioka M., Takahashi Y., Nakayama T., Sawada H., Konno M., Ushijima H., Kikuta H., Ariga T., Ishiguro N. 2012. Detection of human bocaviruses 1 to 4 from nasopharyngeal swab samples collected from patients with respiratory tract infections. – *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (6): 2118 – 2121.

21. Lee J. I., Chung J. Y., Han T. H., Song M. O., Hwang E. S. 2007. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. – *The Journal of Infectious Diseases*, 196 (7): 994-997.

22. Levican J., Navas E., Orizola J., Avendaño L. F., Gaggero A. 2013. Human Bocavirus in Children with Acute Gastroenteritis, Chile, 1985–2010. - *Emerging Infectious Diseases*, 19 (11): 1877–1880.
23. Li J., Yang Y., Dong Y., Li Y., Huang Y., Yi O., Liu K., Li Y. 2013. Key elements of the human bocavirus type 1 (HBoV1) promoter and its trans-activation by NS1 protein. - *Virology Journal*, 10: 315.
24. Lin J. H., Chiu S. C., Lin Y. C., Chen H. L., Lin K. H., Shan K. H., Wu H. S., Liu H. F. 2009. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan. - *Journal of Clinical Virology*, 44: 219 - 224.
25. Longtin J., Bastien M., Gilca R., Leblanc E., de Serres G., Bergeron M. G., Boivin G. 2008. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. – *Emerging Infectious Diseases journal*, 14 (2): 217-221.
26. Lu X., Gooding L. R., Erdman D. D. 2008. Human bocavirus in tonsillar lymphocytes. – *Emerging Infectious Diseases journal*, 14 (8): 1332-1334.
27. Lüsebrink J., Wittleben F., Schildgen V., Shildgen O. 2009. Human Bocavirus – Insights into a Newly Identified Respiratory Virus. – *Viruses*, 1 (1): 3-12.
28. Ma X., Endo R., Ishiguro N., Ebihara T., Ishiko H., Ariga T., Kikuta H. 2006. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with Lower Respiratory Tract Infections. - *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (3): 1132–1134.
29. Manning A., Russell V., Eastick K., Leadbetter G. H., Hallam N., Templeton K., Simmonds P. 2006. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. – *The Journal of Infectious Diseases*, 194 (9): 1283-1290.
30. Matrtin E. T., Fairchok M. P., Kuypers J., Magaret A., Zerr D. M., Wald A., Englund J. A. 2010. Frequent and Prolonged Shedding of Bocavirus in Young Children Attending Daycare. – *The Journal of Infectious Diseases*, 201 (11): 1625-1632.
31. Misigo D., Mwaengo D., Mburu D. 2014. Molecular detection and phylogenetic analysis of Kenyan human bocavirus isolates. - *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (2): 221 – 227.
32. Mori D., Ranawaka U., Yamada K., Rajindrajith S., Miya K., Perera K. H. K., Matsumoto T., Dassanayake M., Mitui M. T., Mori H., Nishizono A., Söderlund-Venermo M., Ahmed K. 2013. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010. - *Emerging Infectious Diseases journal*, 19 (11): 1859–1862.
33. Mitui M. T., Tabib S. M. S. B., Matsumoto T., Khanam W., Ahmed S., Mori D., Akhter N., Yamada K., Kabir L., Nishizono A., Söderlund-Venermo M., Ahmed K. 2012.

Detection of human bocavirus in the cerebrospinal fluid of children with encephalitis. - *Clinical Infectious Diseases*, 54: 964–967.

34. Nawaz S., Allen D. J., Aladin F., Gallimore C., Iturriza-Gómara M. 2012. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK. - *PLoS ONE*, 7: e41346.

35. Ozawa K.J., Ayub J., Yu- Shu H., Kurtzman G., Shimada T. And Young N. 1987. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. – *Journal of Virology*, 61: 2395-2406.

36. Pedrosa-Corral I., Pérez-Ruiz M., Navarro-Marí J. M., Ruiz-Bravo A. 2011. Association of Human bocavirus with Respiratory Infections in Outpatients and in Patients Attended at a Reference Hospital. - *Indian Journal of Virology*, 22 (2): 84–89.

37. Pozo F., García-García M. L., Calvo C., Cuesta I., Pérez-Breña P., Casas I. 2007. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. - *Journal of Clinical Virology*, 40: 224–228.

38. Renaud C., Campbell A. P. 2011. Changing Epidemiology of Respiratory Viral Infections in Hematopoietic Cell Transplant Recipients and Solid Organ Transplant Recipients. - *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24 (4): 333–343.

39. Risku M., Kätkä M., Lappalainen S., Räsänen S., Vesikari T. 2012. Human bocavirus types 1, 2 and 3 in acute gastroenteritis of childhood. - *Acta Paediatrica*, 101: e405–410.

40. Schildgen O., Müller A., Allander T., Mackay I. M., Völz S., Kupfer B., Simon A. 2008. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? – *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (2): 291-304.

41. Schildgen V., Malecki M., Tillmann R. L., Brockmann M., Schildgen O. 2013. The Human Bocavirus Is Associated with Some Lung and Colorectal Cancers and Persists in Solid Tumors. – *PLoS One*, 8 (6): e68020.

42. Sloots T. P., McErlean P., Speicher D. J., Arden K. E., Nissen M. D., Mackay I. M. 2006. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. – *Journal of Clinical Virology*, 35: 99 – 102.

43. Song J. R., Jin Y., Xie Z. P., Gao H. C., Xiao N. G., Chen W. X., Xu Z. Q., Yan K. L., Zhao Y., Hou Y. D., Duan Z. J. 2010. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. - *Emerging Infectious Diseases*, 16 (2): 324 – 327.

44. de Sousa T. T., Souza M., Souza Fiaccadori F., Borges A. M. T., da Costa P. S., das Dores de Paula Cardoso D. 2012. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. – *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (6): 800-804.

45. Tewary S. K., Zhao H., Shen W., Qiu J., Tang L. 2013. Structure of the NS1 protein N-terminal origin recognition/nickase domain from the emerging human bocavirus. - *Journal of Virology*, 87 (21): 11487 – 11493.
46. Vicente D., Cilla G., Montes M., Pérez-Yarza E. G., Pérez-Trallero E. 2007. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. - *Emerging Infectious Diseases*, 13 (4): 636 – 637.
47. Zaghoul M. Z. 2011. Human bocavirus (HBoV) in children with respiratory tract infection by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and qualitative polymerase chain reaction (PCR). – *Virology Journal*, 8: 239.
48. Zhao B., Yu X., Wang C., Teng Z., Wang C., Shen J., Gao Y., Zhu Z., Wang J., Yuan Z., Wu F., Zhang X., Ghildyal R. 2013. High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. – *PLoS One*, 8 (4): e62318.
49. Zhou W., Lin F., Teng L., Li H., Hou J., Tong R., Zheng C., Lou Y., Tan W. 2013. Prevalence of Herpes and Respiratory Viruses in Induced Sputum among Hospitalized Children with Non Typical Bacterial Community-Acquired Pneumonia. – *PLoS One*, 8 (11): e79477.
50. Hulo C., de Castro E., Masson P., Bougueleret L., Bairoch A., Xenarios I., Mercier P. 2011. ViralZone. Key: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html.
51. Hunt R. 2010. Microbiology and Immunology On-line. Key: <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>.