

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

CILVĒKA BOKAVĪRUSA IESAISTE DZIĻĀKO ELPCEĻU  
SLIMĪBU UN AKŪTA GASTROENTERĪTA  
PATOĢENĒZĒ HOSPITALIZĒTIEM BĒRNIEM

Maģistra darbs

Autore: Anda Vilmane  
Stud. apl. Nr. av11175  
Darba vadītāja: Dr. med. Zaiga Nora-Krūkle

RĪGA 2016

## KOPSAVILKUMS

Dziļāko elpceļu slimības un akūts gastroenterīts ir galevnais cēlonis bērnu saslimšanai un mirstībai visā pasaulē. Arī Latvijas bērnu populācijā šīs slimības ir bieži sastopamas, tomēr ne vienmēr ir zināms šo slimību etioloģiskais aģents.

Cilvēka bokavīruss (HBoV) ir 2005. gadā atklāts parvovīruss, ko saista ar elpceļu slimību un akūta gastroenterīta izraisīšanu bērniem.

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot HBoV iesaisti dziļāko elpceļu slimību un akūta gastroenterīta patoģenēzē hospitalizētiem bērniem.

Šajā pētījumā 46,03% bērnu ar dziļāko elpceļu slimībām un 16,67% bērnu ar akūtu gastroenterītu detektēta HBoV genoma sekvenses klātbūtne organismā. Sekvencējot noteikts, ka pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām sastopams HBoV1, savukārt pacientiem ar akūtu gastroenterītu – HBoV2 un HBoV3. Akūta HBoV1 infekcija konstatēta 13 bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām.

Secinājums: Bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām konstatē HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni organismā, bet pacientiem ar gastroenterītu – HBoV2 un HBoV3. Atsevišķos gadījumos HBoV1 izraisa smagas elpceļu slimības bērniem, savukārt HBoV2 un HBoV3 iesiaste gastroenterīta etiopatoģenēzē nav pierādīta.

Atslēgvārdi: HBoV1-3, dziļāko elpceļu slimības, akūts gastroenterīts, bērni.

## SUMMARY

Lower respiratory tract diseases and acute gastroenteritis is the main cause of children morbidity and mortality worldwide. These diseases are also commonly found in children population in Latvia however the etiological agent of these diseases is not always known.

Human bocavirus (HBoV) is a parvovirus discovered in 2005, which is associated with respiratory tract diseases and acute gastroenteritis in children.

The aim of this study was to determine HBoV involvement in lower respiratory tract diseases and acute gastroenteritis pathogenesis in hospitalized children.

In this study, HBoV genome sequence was detected in 46.03% of children with lower respiratory tract diseases, and in 16.67% of children with acute gastroenteritis. By sequencing it was determined that HBoV1 is present in patients with lower respiratory tract diseases, while HBoV2 and HBoV3 in patients with acute gastroenteritis. Acute infection of HBoV1 was detected for 13 children with lower respiratory diseases.

Conclusion: HBoV1 genome sequence is present in children with lower respiratory tract diseases, but in patients with gastroenteritis - HBoV2 and HBoV3. In certain cases HBoV1 causes severe respiratory tract diseases in children while HBoV2 and HBoV3 involvement in gastroenteritis etiopathogenesis is not proven.

Keywords: HBoV1-3, lower respiratory tract diseases, acute gastroenteritis, children.

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AAV – adenoasociētais vīruss

AAV1 – adenoasociētā vīrusa serotips 1

AAV2 – adenoasociētā vīrusa serotips 2

AAV3 – adenoasociētā vīrusa serotips 3

AAV4 – adenoasociētā vīrusa serotips 4

AAV5 – adenoasociētā vīrusa serotips 5

AAV9 – adenoasociētā vīrusa serotips 9

AdV – adenovīruss

ARTI – akūta respiratorā trakta infekcija

B19 – cilvēka parvovīruss B19

BMC – Latvijas biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

bp – bāžu pāri

BPV – liellopu parvovīruss

CoV – koronavīruss

CoVNL63 – koronavīruss NL63

CoVOC43 – koronavīruss OC43

CoV229E – koronavīruss 229E

CRO – C-reaktīvais olbaltums

CsIBoV - Kalifornijas jūras lauvas bokavīruss

CSF – cerebrospinalais šķidrums (*cerebrospinal fluid*)

DEPC – dietilpirokarbonāts

DNāze - dezoksiribonukleāze

DNS – dezoksiribonukleīnskābe (*deoxyribonucleic acid – DNA*)

dNTP – dezoksiribonukleotīdfosfāts

EIA – enzīmmunoloģiskais tests (*Enzyme immunoassay – EIA*)

ELISA - imūnenzīmētiskais tests (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

FluA – A tipa gripas vīruss (*influenza A*)

FluA-H1 – A tipa gripas vīrusa apakštīps H1 (*Influenza A virus subtype H1*)

FluA-H3 – A tipa gripas vīrusa apakštīps H3 (*Influenza A virus subtype H3*)

FluA-H1pdm09 – A tipa gripas vīrusa apakštīps H1pdm09 (*Influenza A virus subtype H1pdm09*)

FluB – B tipa gripas vīruss (*influenza B*)

GBoV – gorillu bokavīruss

HBoV – cilvēka bokavīruss  
HBoV1 – cilvēka bokavīrusa pirmais tips  
HBoV2 – cilvēka bokavīrusa otrais tips  
HBoV3 – cilvēka bokavīrusa trešais tips  
HBoV4 – cilvēka bokavīrusa ceturtais tips  
IFN - interferons  
IL - interleikīns  
MPV – cilvēka metapneumovīruss  
HEV – cilvēka enterovīruss  
HRV – cilvēka rinovīruss  
HSV – herpes simplekss vīruss  
IgG – imūnglobulīns G  
IgM – imūnglobulīns M  
kb – kilobāze  
kDNS – komplementārā dezoksiribonukleīnskābe (*complementary deoxyribonucleic acid – cDNA*)  
MgCl<sub>2</sub> – magnija hlorīds  
mRNS – mesendžera ribonukleīnskābe (*messenger ribonucleic acid – mRNA*)  
MVC – suņu parvovīruss  
MVM – peļu minūtes vīruss  
NFA – nazoarengiālais aspirāts  
NFI – nazofaringeālā iztriepe  
nm – nanometrs  
nPKĶR - polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimerēšanu (*nested polymerase chain reaction - nPCR*)  
NP1 – kodola fosfoproteīns 1  
NS1 – nestrukturālais proteīns 1  
NVG1 – norovīruss GI  
NVG2 – norovīruss GII  
ORF – atvērtais nolasīšanas reģions (*open reading frame*)  
PARV4 – cilvēka parvovīruss 4  
PARV5 – cilvēka parvovīruss 5  
PBMC – perifēro asiņu mononukleārās šūnas  
PBoV – cūku bokavīruss  
PIV – paragripas vīruss (*parainfluenza virus*)

PIV1 – pirmā tipa paragripas vīruss (*parainfluenza virus type 1*)  
PIV2 – otrā tipa paragripas vīruss (*parainfluenza virus type 2*)  
PIV3 – trešā tipa paragripas vīruss (*parainfluenza virus type 3*)  
PIV4 – ceturtā tipa paragripas vīruss (*parainfluenza virus type 4*)  
PĶR – polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction – PCR*)  
PPV – cūku parvovīruss  
PVO – Pasaules Veselības organizācija  
RNS – ribonukleīnskābe (*ribonucleic acid - RNA*)  
ROV - rotavīruss  
RSV – respiratori sincitiālais vīruss  
RSVA – respiratori sincitiālais vīruss A  
RSVB – respiratori sincitiālais vīruss B  
RT-PĶR – reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija (*reverse transcription polymerase chain reaction – RT-PCR*)  
SDS – nātrija dodecilsulfāts  
ssDNS – vienpavediena dezoksiribonukleīnskābe (*single stranded deoxyribonucleic acid – ssDNA*)  
SV – sapovīruss  
TNF- audzēju nekrozes faktors (*tumor necrosis factor*)  
TTV – TT vīruss (*Transfusion Transmitted virus*)  
VLPs – vīrusveidīgās daļiņas (*virus-like particles*)  
VP – vīrusa proteīns  
VP1 – vīrusa proteīns 1  
VP2 – vīrusa proteīns 2  
VP3 – vīrusa proteīns 3  
ZPNS – zīdaiņu pēkšņās nāves sindroms  
qPĶR – kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (*quantitative polymerase chain reaction – qPCR*)

## SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS .....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	12
1.1. Cilvēka bokavīrusa (HBoV) atklāšana .....	12
1.2. HBoV klasifikācija .....	12
1.3. HBoV genoms.....	13
1.4. HBoV struktūra.....	15
1.5. HBoV1 epidemioloģija .....	17
1.6. HBoV2-4 epidemioloģija.....	18
1.7. HBoV1 saistība ar elpceļu slimībām .....	18
1.8. HBoV1-4 saistība ar gastroenterītu.....	19
1.9. HBoV un citas slimības .....	20
1.10. HBoV un koinfekcijas .....	21
1.11. HBoV transmisija .....	21
1.12. HBoV1 patogēnēze un mērķa orgāni.....	22
1.13. HBoV persistence .....	23
2. METODIKA.....	24
2.1. Pacienti un paraugi.....	24
2.2. DNS izdalīšana no NFA, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazms.....	26
2.3. DNS izdalīšana no fēcēm.....	26
2.4. RNS izdalīšana no PBMC.....	27
2.5. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana.....	27
2.6. kDNS sintezēšana .....	27
2.7. DNS un kDNS kvalitātes pārbaude .....	27
2.8. HBoV1 genoma sekvenču noteikšana ar PĶR .....	28
2.9. HBoV1 genoma sekvenču noteikšana kDNS paraugos ar PĶR.....	29
2.10. HBoV1-4 genoma sekvenču noteikšana paraugos ar nPĶR .....	30
2.11. Elektroforēze.....	32
2.12. Paraugu sagatavošana sekvenču noteikšanai .....	32
2.12.1. PĶR amplikonu attīrīšana .....	32
2.12.2. PĶR amplikonu ekstrakcija no gēla .....	33
2.12.3. Klonēšanas PĶR.....	33
2.13. HBoV slodze noteikšana ar qPĶR.....	34

2.14. Koinfekciju noteikšana ar multiplex reālā laika PQR .....	34
2.15. HBoV specifisko IgG un IgM klases antivielu noteikšana.....	35
2.16. Citokīnu līmeņa noteikšana .....	35
2.17. Statistikas metodes.....	35
2.18. Materiāli.....	36
2.18.1. Reaģenti.....	36
2.18.2. Aprīkojums.....	38
3. REZULTĀTI .....	39
3.1. HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām .....	39
3.2. HBoV1-4 VP1/VP2 gēna sekvenses klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu .....	40
3.3. Sekvencēšanas rezultāti .....	42
3.4. Vīrusa slodzes noteikšana ar qPQR .....	42
3.5. Koinfekciju noteikšana .....	43
3.5.1. Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām.....	43
3.5.2. Kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu.....	46
2.13. HBoV specifisko antivielu klātbūtne plazmas paraugos.....	46
2.14. Citokīnu līmenis plazmā.....	48
3.8. Klīniskais raksturojums pacientiem, kuriem konstatēta tikai HBoV infekcija.....	49
3.8.1. Pacienti ar dziļāko elpceļu slimībām.....	49
3.8.2. Pacienti ar akūtu gastroenterītu .....	49
4. DISKUSIJA.....	51
5. Secinājumi .....	58
6. PATEICĪBAS .....	59
7. Literatūras saraksts .....	60
PIELIKUMI.....	70

## IEVADS

Virāla augšējo un dziļāko elpceļu infekcija ir viena no visbiežāk sastopamajām infekcijām starp cilvēkiem (Berry et al. 2015). Turklāt elpceļu infekcijas bieži rezultējas ar pacientu saslimšanu un mirstību. Biežāk ar elpceļu slimībām slimo zīdaiņi un bērni, vidēji sasniedzot piecas līdz sešas slimību epizodes gadā (Chonmaitree et al. 2008). Ir pierādīts, ka bērniem dziļāko elpceļu slimības pārsvarā izraisa virāla infekcija (Woensel et al. 2003). Daudzu vīrusu izraisīta infekcija ir ierobežota tikai augšējos elpceļos, tomēr virāla dziļāko elpceļu infekcija izraisa smagākas saslimšanas (Henrickson et al. 2004). Augšējo un dziļāko elpceļu slimības ir galvenais nāves cēlonis bērniem līdz piecu gadu vecumam visā pasaulē (Berry et al. 2015). Amerikas Savienotajās Valstīs (ASV) katru gadu aptuveni 30000 bērni pirmā dzīves gada laikā tiek hospitalizēti ar dziļāko elpceļu infekciju (Shay et al. 1999). Jaunattīstības valstīs katru gadu akūta elpceļu slimība izraisa aptuveni 1,9 miljonu bērnu nāvi (Husted and Vazquez 2010). Akūta elpceļu slimība ir arī galvenais drudža izraisītājs un iemesls zīdaiņiem, kas jaunāki par trīs mēnešiem, hospitalizēšanai. Vīrusi, kurus visbiežāk saista ar dziļāko elpceļu slimību etioloģiju ir respiratori sincitiālais vīruss (RSV); A un B tipa gripas vīruss; pirmā, otrā un trešā tipa paragripas vīruss un adenovīruss (Henrickson et al. 2004; Nichols et al. 2008; Pavia 2011). 21. gs. sākumā ir atklāti vismaz seši jauni vīrusi, kas tiek saistīti ar elpceļu slimībām: metapneimovīruss (MPV); koronavīrusi NL63 un HKU1; ceturtais tipa paragripas vīruss un cilvēka bokavīrusa pirmais tips (HBoV1) (Pavia 2011). Pierādīts, ka rinovīruss, ko uzskata par augšējo elpceļu patogēnu, ir sastopams arī dziļāko elpceļu slimību gadījumā (Husted and Vazquez 2010). Turklāt daudzos elpceļu slimību gadījumos, pacientam vienlaicīgi konstatē vairāku respiratoro vīrusu klātbūtni organismā (Pinky and Dobrovolsky 2016). Elpceļu slimību gadījumā, pēc klīniskajām pazīmēm, bieži vien ir neiespējami noteikt konkrētu virālo vai bakteriālo patogēnu. (Pavia 2011).

Arī akūts gastroenterīts ir viena no visbiežāk sastopamajām slimībām cilvēku populācijā un var būt iemesls cilvēku mirstībai visā pasaulē (Wilhelmi et al. 2003). Visbiežāk ar akūtu gastroenterītu slimo bērni līdz piecu gadu vecumam, un ir aprēķināts, ka šajā vecuma grupā katru gadu ir vairāk nekā 700 miljoni akūtas caurejas gadījumu (Snyder and Merson 1982). Tiek lēsts, ka gastroenterīts ir iemesls trīs līdz piecu miljonu cilvēku nāvei katru gadu, ar īpatnību tieši jaunattīstības valstīs. Jau 20. gs. 40. gados, vīrusus sāka uzskatīt par iespējamajiem gastroenterīta izraisītājiem. Tomēr, tas netika pierādīts līdz 1972. gadam, kad virusologs *Albert Kapikian* identificēja Norvalkas vīrusu fēču paraugos no bērniem ar caureju (Kapikian et al. 1972). Gadu vēlāk, 1973. gadā, virusoloģe *Ruth Frances Bishop* novēroja rotavīrusa klātbūtni divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā bērniem ar gastroenterītu (Bishop et al.

1973). 1975. gadā astrovīruss un zarnu adenovīruss tika atrasti fēču paraugos no bērniem ar akūtu caureju (Madeley and Cosgrove 1975; Flewett et al. 1975). Kopš tā laika ir strauji pieaudzis vīrusu skaits, ko asociē ar gastroenterīta izraisīšanu cilvēkiem, piemēram, koronavīrusi, pikobirnavīrusi, pestivīrusi un torovīrusi (Wilhelmi et al. 2003). Kā arī, salīdzinoši nesen atklātais, HBoV tiek saistīts ar gastroenterīta izraisīšanu (Arthur et al. 2009; Han et al. 2009; Chow et al. 2010; Santos et al. 2010).

HBoV1 ir parvovīruss, kas atklāts 2005. gadā Zviedrijā, izmantojot inovatīvu vīrusu skrīninga metodi. Vīruss atrasts rīkles aspirātu paraugos, kas ņemti no pacientiem ar elpceļu slimībām. Tas pieder *Parvoviridae* dzimtai, *Parvovirinae* apakšdzimti un *Bocaparvovirus* ģintij (Allander et al. 2005; Cotmore et al. 2014). Pāris gadus vēlāk, 2009. un 2010. gadā, atklāja HBoV otro, trešo un ceturto tipu (HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4). HBoV2-4 atrasts fēču paraugos no pacientiem ar gastroenterītu (Kapoor et al. 2009, Arthur et al. 2009, Kapoor et al. 2010). HBoV1 primāri inficē elpceļus un to klasificē kā elpceļu patogēnu. HBoV2-4, no kuriem HBoV2 un HBoV3 tiek saistīti ar gastroenterītu, primāri inficē kuņģa-zarnu traktu un visbiežāk vīrusu detektē fēču paraugos (Jartti et al. 2012).

HBoV ir parvovīrusiem raksturīgs ikosaedriskas simetrijas, bezapvalka kapsīds ar diametru ~25 nm. HBoV ir vienpavediena DNS (ssDNA) genoms ar garumu ~5,3 kb (Böhmer et al. 2009). Vīrusa genoms satur trīs atvērtās nolasīšanas reģioni (ORF), kas secīgi kodē nestrukturālo proteīnu NS1, nestrukturālo proteīnu NP1 un divus strukturālos proteīnus VP1 un VP2 (Gurda et al. 2010).

HBoV atrod visā pasaulē, galvenokārt, elpceļu paraugos no pacientiem ar elpceļu slimībām vai fēču paraugos no pacientiem ar akūtu gastroenterītu, taču vīruss atrasts arī asiņu, seruma, urīna, mandeļu, siekalu paraugos, kā arī upju un notekūdeņos (Dijkman et al. 2009; Jartti et al. 2012; Mori et al. 2013). HBoV tiek saistīts arī ar citām slimībām. Piemēram, HBoV DNS atrasta plaušu un kolorektālā vēža audos (Schildgen et al. 2013), kā arī vairākos pētījumos HBoV konstatēts cerebrospinalā šķidrums (CSF) paraugos, kas iegūti no bērniem ar encefalītu (Mori et al. 2013; Yu et al. 2013; Mitui et al. 2012).

HBoV1 ir ceturtais biežāk detektētais respiratorais vīruss pasaulē, ko vidēji atrod 2-33% elpceļu slimību gadījumos bērniem, kas jaunāki par diviem gadiem (Tabasi et al. 2016). HBoV1 ir sastopams visās cilvēku vecuma grupās, kaut gan pieaugušajiem vīrusa klātbūtni organismā konstatē reti. HBoV1 pārsvarā inficē bērnus vecumā no sešiem līdz 24 mēnešiem (Berry et al. 2015). Bieži HBoV1 infekcijas gadījumā tiek konstatēta koinfekcija ar citiem respiratorajiem vīrusiem, īpaši ar RSV (Tabasi et al. 2016). HBoV1 klātbūtni organismā bieži vien konstatē arī asimptomātiskiem cilvēkiem (Schildgen et al. 2008; Martin et al. 2010), kas HBoV1 asociāciju ar elpceļu slimībām padara neskaidru. Pretēji HBoV1, HBoV2-4

galvenokārt atrod cilvēka fēcēs (Arthur et al 2009; Kapoor et al. 2009; Kapoor et al. 2010; Han et al. 2009; Santos et al. 2010), bet retos gadījumos - elpceļu sistēmā (Chieochansin et al. 2009; Shen et al. 2013). Līdz ar HBoV serodiagnostikas izstrādāšanu un ieviešanu pētījumos, ir kļuvis vieglāk spriest par HBoV saistību ar slimību izraisīšanu (Kantola et al. 2008; Don et al. 2010; Hedman et al. 2010).

Šis ir pirmais pētījums Latvijā, kurā tiek noteikta HBoV klātbūtne bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām vai akūtu gastroenterītu, un tā iesaiste slimību izraisīšanā.

Pētījums izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā. Pētījums tapis RSU zinātniskā projekta Nr. ZP 17/2013 „Cilvēka bokavīrusa (HBoV) tipu epidemioloģija, patogenitāte un iespējamā asociācija ar dziļāko elpceļu slimībām un akūtu gastroenterītu bērniem” ietvaros.

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot HBoV iesaisti dziļāko elpceļu slimību un akūta gastroenterīta patoģenēzē hospitalizētiem bērniem.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noteikt HBoV genoma sekvenču klātbūtni un HBoV slodzi pētījumā iekļautajās grupās;
2. Noteikt HBoV mRNS klātbūtni PBMC paraugos;
3. Noteikt HBoV1-4 specifiskās IgG un IgM klases antivielas plazmā;
4. Analizēt citokīnu (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13) līmeni plazmā;
5. Noteikt koinfekcijas ar citiem patogēniem;
6. Noteikt HBoV tipu izmeklējamajā materiālā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Cilvēka bokavīrusa (HBoV) atklāšana

Cilvēka bokavīrusu (HBoV) atklāja zinātnieks *Tobias Allander* ar kolēģiem 2005. gadā Zviedrijā, Karolinskas Universitātes laboratorijā veiktā pētījumā. Eksperimentā izmantoja, pēc nejaušības principa izvēlētus, rīkles aspirātu paraugus, kas ņemti no pacientiem ar elpceļu slimībām (Allander et al. 2005), pielietojot inovatīvu molekulāru vīrusu skrīninga metodi, kas pielāgota vīrusu detekcijai elpceļu paraugos. Izmantotās metodes pamatā ir pieci posmi: 1) mehāniska un enzīmātiska saimniekorganisma DNS noārdīšana, lai palielinātu vīrusu nukleīnskābju daudzumu; 2) vīrusu DNS amplifikācija ar „*random PCR*”; 3) iegūto „*random PCR*” produktu klonēšana; 4) klonu sekvencēšana; 5) sekvencēšanas rezultātu automatizēta rediģēšana un datubāžu meklēšana. Eksperimentā detektēja septiņas vīrusu sugas: A tipa gripas vīrusu, respiratori sincitiālo vīrusu (RSV), metapneimovīrusu, adenovīrusu, koronavīrusu HKU1, TT vīrusu (TTV), kā arī vēl neidentificētu parvovīrusu, ko nosauca par HBoV (vēlāk par HBoV1) (Allander et al. 2005).

2009. gadā zinātnieks *Amit Kapoor* ar kolēģiem atklāja HBoV otro tipu (HBoV2), izmantojot molekulāro vīrusu skrīninga metodi, pielāgojot, to fēču paraugu analizēšanai. HBoV2 atrasts fēču paraugos no pacientiem ar gastrointestinālu infekciju, kā arī fēču paraugos, kas iegūti no veselīgiem bērniem (Kapoor et al. 2009).

Izmantojot šo pašu metodi, 2009. gadā Austrālijā zinātniece *Jane Arthur* ar kolēģiem atklāja HBoV trešo tipu (HBoV3). Vīruss atrasts fēču paraugos, kas ņemti no bērniem ar akūtu gastroenterītu (Arthur et al. 2009).

Zinātnieks *Amit Kapoor* 2010. gadā atklāja HBoV ceturto tipu (HBoV4). Arī šis HBoV tips atrasts fēču paraugos, kas iegūti no pacientiem ar zarnu trakta slimībām (Kapoor et al. 2010).

## 1.2. HBoV klasifikācija

Ņemot vērā HBoV genoma struktūras līdzību ar, *Bocavirus* ģintij piederošajiem, suņu parvovīrusu (MVC) un liellopu parvovīrusu (BPV), HBoV pieskaitīja *Parvoviridae* dzimtai, *Parvovirinae* apakšdzimtai un *Bocavirus* ģintij (Allander et al. 2005). Pirmo bokavīrusu identificēja govīs, un *Bocavirus* ģints nosaukums ir radies no bokavīrusu pirmo saimniekorganismu nosaukumu salikuma – govs (*bovine*) un suns (*canine*). Laika posmā no 2005. līdz 2013. gadam, papildus HBoV1-4, ir atklāti vairāki jauni bokavīrusi. Tie ir gorillu

bokavīruss (GBoV), cūku bokavīruss (PBoV) un Kalifornijas jūras lauvas bokavīruss 1-4 (Csl BoV1-4) (Kapoor et al. 2010; Cheng et al. 2010; Li et al. 2011). Dzīvnieku bokavīrusi izraisa elpceļu un kuņģa-zarnu trakta slimības dzīvniekiem, kā arī var izraisīt embrija nāvi. Zinātnieki ir izvirzījuši hipotēzi, ka HBoV ir zoonotiska izcelsme, balstoties uz strukturālo līdzību ar MVC un BPV. Šo hipotēzi apstiprina fakts, ka starp cūku, gorillu, šimpanžu un jūras lauvas bokavīrusiem, primātu bokavīrui uzrāda lielāko līdzību ar HBoV (Kapoor et al. 2010). 2014. gadā *Parvoviridae* dzimta tika racionalizēta un paplašināta, un tagad HBoV pieskaita pie *Bocaparvovirus* ģints (Cotmore et al. 2014). Šobrīd zināmi četri HBoV tipi: HBoV1, HBoV2, HBoV3 un HBoV4 (Berry et al. 2015). Papildus HBoV, daudzi *Parvoviridae* dzimtas vīrusi cirkulē cilvēku populācijā - vairāki dependovīrusi; adeno-asociētā vīrusa (AAV) serotipi AAV1, AAV2, AAV3, AAV5 un AAV9; parvovīruss B19 (B19); un salīdzinoši nesekmīgi atklātie cilvēka parvovīruss 4 (PARV4) un cilvēka parvovīruss 5 (PARV5). No uzskaitītajiem vīrusiem, tikai B19 un PARV4 saistīta ar slimību izraisīšanu cilvēkiem, un pirms HBoV un PARV4 atklāšanas, B19 ilgu laiku bija vienīgais zināmais cilvēka patogēns *Parvoviridae* dzimtā (Gurda et al. 2010). HBoV1 klasificē kā autonomu vīrusu, jo tas detektējams cilvēka organismā bez koinfekcijām, kā arī, tas spēj replicēties primārā cilvēka šūnu kultūrā bez palīgvīrusu klātbūtnes (Schildgen et al. 2012).

### 1.3. HBoV genoms

HBoV satur negatīvas polaritātes, vienpavediena DNS (ssDNS) ar izmēru, apmēram, 5,3 kb (Böhmer et al. 2009). HBoV genomam ir labās un kreisās puses „matadatas” struktūra (Tewary et al. 2013).

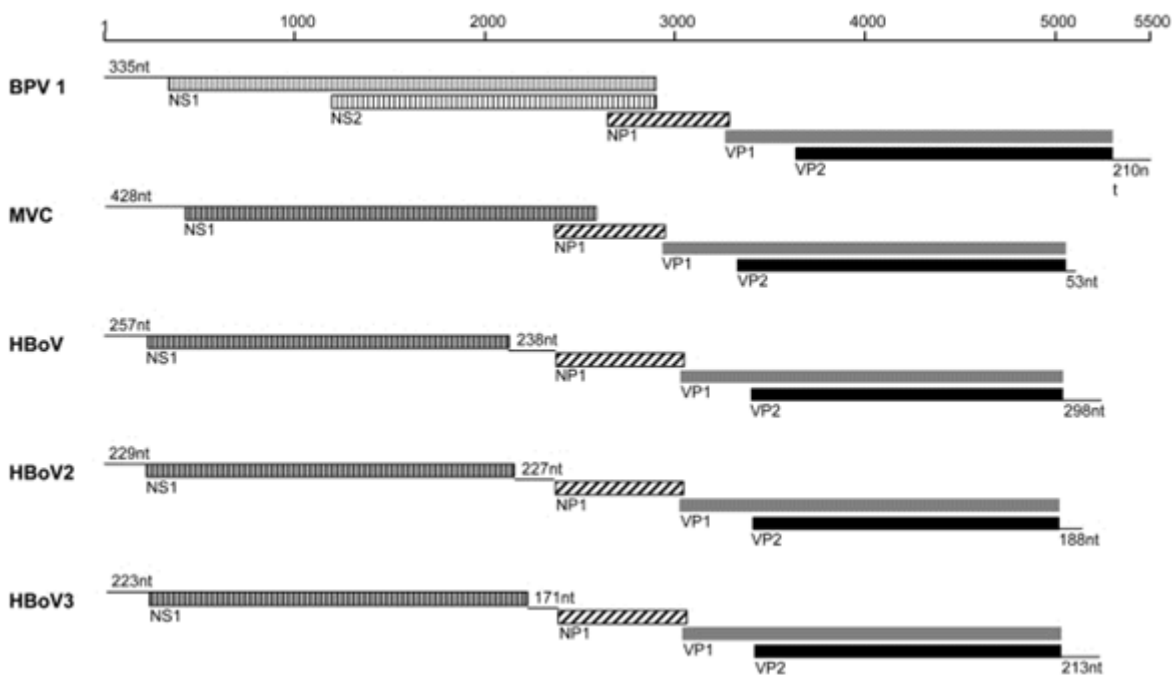
Atšķirībā no B19 un PARV4 genoma, kas satur divas atvērtās nolasīšanas reģionus (ORF), visiem bokavīrusiem, tai skaitā arī HBoV, ir trīs ORFi (1. att.) (Kapoor et al. 2010).

Tāpat kā citiem parvovīrusiem, pirmā ORF 5' galā kodē nestrukturālo proteīnu NS1, kas regulē parvovīrusa promoteri. NS1 ir daudzfunkcionāls proteīns, kam ir nozīmīga loma vīrusa DNS replikācijā, šūnu cikla apstādināšanā, gēnu transaktivācijā un vīrusa kapsīda veidošanā (Schildgen et al. 2012; Tewary et al. 2013; Doerig et al. 1990), tas varētu būt iesaistīts arī šūnu apoptozes izraisīšanā, DNS bojājumu atbildes reakcijas un iedzimtās 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). Otrā ORF kodē, *Bocaparvovirus* ģintij unikālo, nestrukturālo proteīnu – kodola fosfoproteīnu NP1 (Dijkman et al. 2009). Pētījumos par MVC ir pierādīts,

ka NP1 proteīnam ir būtiska loma vīrusa replikācijā (Sun et al. 2009). Uzskata, ka arī HBoV NP1 proteīns nodrošina efektīvāku vīrusa DNS replikāciju (Shen et al. 2015). Trešā ORF 3' galā kodē divas strukturālās olbaltumvielas VP1 un VP2, kas veido vīrusa kapsīdu (Dijkman et al. 2009).

HBoV VP1 un VP2 proteīnu līdzība ar BPV un MVC VP1 un VP2 proteīniem, attiecīgi, ir 42% un 43% (Allander et al. 2005). Savstarpēji salīdzinot HBoV1-3 genoma proteīnus, ir noteikts, ka HBoV2 un HBoV3 proteīnu līdzība ar HBoV1 attiecīgi ir: ~80 un 90% NS1, ~70 un 80% NP1, ~80 un 80% VP proteīnu gadījumā (Arthur et al. 2009).

Analizējot HBoV1-4 genoma sekvences, zinātnieki ir secinājuši, ka HBoV3 varētu būt izveidojies HBoV1 un HBoV2 rekombinācijas rezultātā, savukārt, HBoV4 radies HBoV2 un HBoV3 rekombinācijas ceļā (Kapoor et al. 2010).



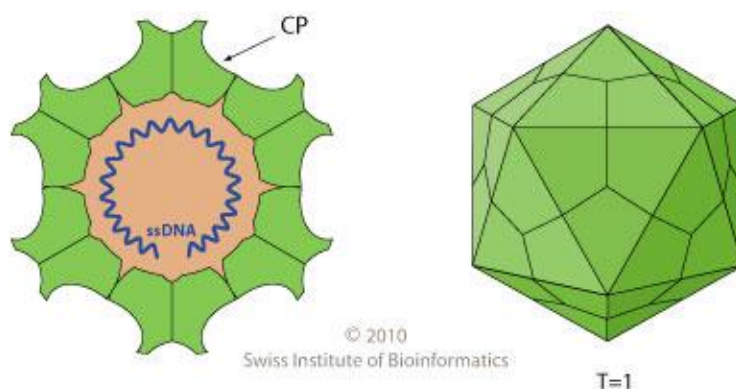
1.attēls. HBoV1-3 genomi (Arthur et al. 2009).

Figure 1. The HBoV1-3 genomes (Arthur et al. 2009).

## 1.4. HBoV struktūra

Elektronu mikroskopija parāda, ka HBoV, līdzīgi kā citiem parvovīrusiem, ir T=1 simetrijas, ikosaedrisks bezapvalka kapsīds, kas sastāv no 60 strukturālo proteīnu kopijām, un kapsīda diametrs ir, apmēram, 25 nm (2. att.) (3. att.) (Gurda et al. 2010; Jartti et al. 2012). Vienkāršā struktūra un lipīdu membrānas trūkums, parvovīrusa kapsīdu padara ļoti izturīgu pret ārējās vides apstākļiem. Piemēram, BPV izdzīvo pēc 30 min karsēšanas 100°C temperatūrā un pat pēc trīs stundu karsēšanas 60°C temperatūrā (Bräuniger et al. 2000). Parvovīrusu kapsīdam piemīt daudzas funkcijas, ieskaitot, iekļūšanu un izkļūšanu no saimniekorganisma šūnām (Kailasan et al. 2015).

Pētījumi par B19 parāda, ka ~95% no kapsīda ir veidoti no VP2 proteīna vienībām (Ozawa et al. 1987). VP2 proteīna sekundārās struktūras pamatelementi ir saglabājušies nemainīgi pat starp vairākām parvovīrusu ģintīm, bet mainīgās virsmas cilpas piešķir vīrusam saimniekorganisma specifisko tropismu un atšķirīgas antigēnu īpašības (Gurda et al. 2010). Pierādīts, ka HBoV specifisko antivielu mērķa molekula ir VP2 (Jartti et al. 2012). Pārējie ~5% no vīrusa kapsīda sastāv no nelieliem proteīniem, kuru veids ir atkarīgs no konkrētās vīrusa sugas. VP1 molekulas veido nelielu daļu no parvovīrusa kapsīda. Dažiem parvovīrusiem, piemēram, cūku parvovīrusam (PPV) un peļu minūtes vīrusam (MVM), VP2 molekulu preteolītiskās šķelšanās ceļā veidojas VP3 molekulas (Kerr et al. 2006), un uzskata, ka arī HBoV veidojas VP3 molekulas (Cecchini et al. 2009).

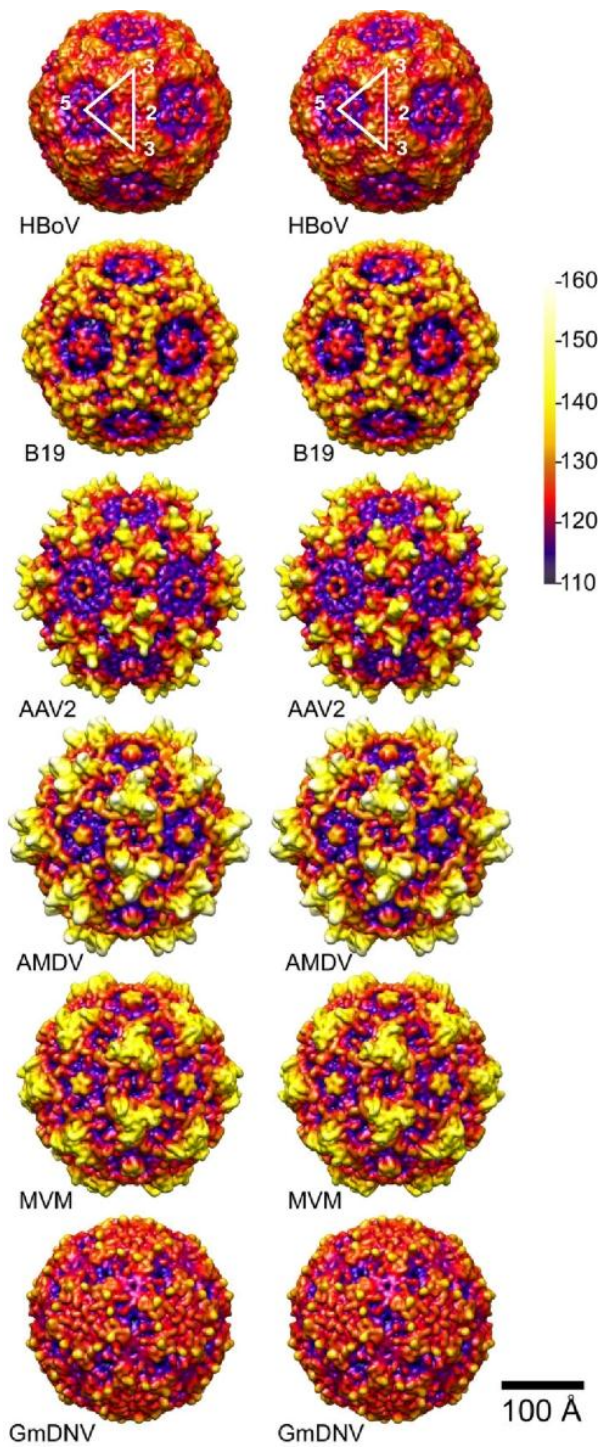


2.attēls. Parvovīrusa struktūra.

([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/567.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/567.html))

Figure 2. Structure of parvovirus.

([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/567.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/567.html))



3. attēls. Parvovīrusu kapsīdu struktūru salīdzinājums (Gurda et al. 2010).

Figure 3. Comparison of parvovirus capsid structures (Gurda et al. 2010).

## 1.5. HBoV1 epidemioloģija

HBoV1 atklāšana veicināja jaunu pētījumu veikšanu visā pasaulē, lai noteiktu HBoV1 klātbūtni pacientiem ar elpceļu slimībām un noteiktu to lomu slimību etioloģijā. (Jartti et al. 2012). HBoV1 ir ceturtais biežāk sastopamais respiratorais patogēns pasaulē. Tā izplatība vidēji ir no diviem līdz 33% bērnu ar elpceļu slimībām (Tabasi et al. 2016). Lai gan HBoV1 ir konstatēts visās vecuma grupās, tomēr pieaugušajiem vīrusu konstatē reti (Berry et al. 2015).

Izmantojot polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodi, HBoV1 DNS klātbūtni detektē ne tikai elpceļu paraugos, bet arī fēču, perifēro asiņu, asins plazmas, seruma, mandeļu, siekalu, urīna paraugos, kā arī upju ūdeņos un notekūdeņos (Jartti et al. 2012; Pozo et al. 2007; Renaud et al. 2011). Kādā pētījumā HBoV1 klātbūtne detektēta mandeļu limfocītos (Lu et al. 2008). Pasaulē veikti pētījumi, kuros HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni atrod fēču paraugos no pacientiem ar akūtu gastroenterītu (Vicente et al. 2007; Romani et al. 2013; Tang et al. 2015). Vairākos pētījumos HBoV1 DNS atrod muguras smadzeņu šķidrums (CSF) paraugos, kas ņemti no pacientiem ar encefalītu (Mitui et al. 2012; Mori et al. 2013; Yu et al. 2013). Kā arī, HBoV1 ir atrasts plaušu un kolorektālā audzēja audu paraugos (Schildgen et al. 2013).

Literatūrā aprakstīti gadījumi, kad HBoV1 infekciju konstatē bērniem bez elpceļu slimību simptomiem. ASV veiktā pētījumā, izmantojot deguma uztriepi paraugos, HBoV1 klātbūtne atrasta 20 no 45 (44%) asimptomātiskiem bērniem (Martin et al. 2010). Kādā pētījumā Kanādā, kurā iekļauti bērni, kuriem veikta plānota ausu, deguna vai rīkles operācija, HBoV1 konstatēts 43 no 100 (43%) NFA paraugos (Longtin et al. 2008). Ir dati par HBoV1 DNS atradni NFA paraugos, kas ņemti no pacientiem ar novājinātu imunitāti, kuriem veikta hematopoētisko šūnu vai orgānu transplantācija (Renaud et al. 2011).

HBoV1 seroloģijas pētījumu rezultāti sakrīt ar rezultātiem, kas iegūti, izmantojot PĶR metodi. HBoV1 visbiežāk sastopams bērniem vecumā no sešiem līdz 24 mēnešiem (Jartti et al. 2012). Zīdaiņiem, kas jaunāki par diviem mēnešiem, bieži novērojama HBoV1 seropozitivitāte. Tas skaidrojams ar faktu, ka bērns HBoV1 antivielas iegūst vertikālās antivielu nodošanas ceļā, no mātes grūtniecības laikā (Endo et al. 2007; Kahn et al. 2008). Pēc divu mēnešu vecuma, HBoV1 seropozitivitāte samazinās, un zems antivielu līmenis bērniem saglabājas no sešu līdz 12 mēnešu vecumam. Aptuveni 90% bērnu līdz piecu gadu vecumam izstrādājas antivielas pret HBoV1, tāpat, kā tas ir citu respiratoro vīrusu gadījumā. Piemēram, gandrīz visiem bērniem līdz piecu gadu vecumam ir izstrādājušās antivielas pret respiratori sincitiālo vīrusu (RSV), rinovīrusu (HRV) un metapneimovīrusu (MPV) (Kahn et al. 2008; Guido et al. 2012; Gurda et al. 2010; Woensel et al. 2003).

## 1.6. HBoV2-4 epidemioloģija

Lai gan cilvēku bokavīrusi uzrāda lielu līdzību aminoskābju un nukleotīdu līmenī, tomēr šķiet, ka tiem ir atšķirīgs audu tropisms. Kā jau pirms tam minēts, HBoV1 ir elpceļu patogēns, un tā klātbūtne fēču paraugos ir reta. Savukārt, HBoV2-4 uzskata par kuņģa-zarnu trakta vīrusiem, jo tā genoma secību klātbūtni pārsvarā detektē DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm, un HBoV2 un HBoV3 saista ar gastroenterīta izraisīšanu (HBoV2 sastopams līdz 26% bērnu ar gastroenterītu, savukārt HBoV3 un HBoV4 detektē krietni retāk, attiecīgi – 5% un 2%. Tāpat, kā HBoV1, arī HBoV2-4 DNS klātbūtni organismā biežāk konstatē bērniem nekā pieaugušajiem (Jartti et al. 2012).

Visbiežāk fēču paraugos konstatē HBoV2, kam seko HBoV3. Pētījumā, kurā iekļauti 900 bērni ar gastroenterītu, HBoV1-3 konstatē attiecīgi – 6%, 3% un 1% (Risku et al. 2012). Plašākā pētījumā, kurā iekļauti 2256 pacienti ar gastroenterītu, HBoV1-3 konstatē attiecīgi – 3%, 22% un 7% gadījumu (Nawaz et al. 2012).

Salīdzinājumā ar HBoV1-3, HBoV4 DNS fēču paraugos detektē visretāk. Divos pētījumos ir ziņots par HBoV4 atradni pacientiem ar kuņģa-zarnu trakta slimībām. Šajos pētījumos HBoV4 DNS konstatēja attiecīgi 2% un 0,5% bērnu (Kapoor et al. 2010; Chieochansin et al. 2009). Citā pētījumā HBoV4 klātbūtni, pārbaudītajos fēču paraugos, nekonstatēja vispār (Wang et al. 2011).

Ir veikti pētījumi, kuros HBoV2-4 DNS atrasta elpceļu uztriepju paraugos (Han et al. 2009; Song et al. 2010; Koseki et al. 2012). Atsevišķā pētījumā, HBoV2 DNS klātbūtne tika detektēta dažāda veida paraugos: deguna uztriepēs, urīnā, asins plazmā, vēdera dobuma šķidrumā, apzarņa mezglā, skeleta muskuļos un plaušu audos (Brebion et al. 2014).

## 1.7. HBoV1 saistība ar elpceļu slimībām

Vairākos pētījumos HBoV1 definē kā respiratoro patogēnu un uzskata par izraisīto aģentu elpceļu slimību gadījumā. Visbiežāk HBoV1 infekciju saista ar tādiem klīniskajiem simptomiem kā sēkšana, drudzis, bronhiolīts, pneimonija un astma (Söderlund-Venermo et al. 2009; Yesilbas et al. 2016; Lüsebrink et al. 2009). Nereti, HBoV1 klātbūtni organismā konstatē asimptomātiskiem cilvēkiem, tomēr tādos gadījumos, vīrusa slodze pārbaudītajos paraugos ir salīdzinoši zema (Lüsebrink et al. 2009)

Atsevišķos pētījumos HBoV1 infekciju saista ar smagām elpceļu slimībām. Kādā pētījumā, kas veikts Vācijā, bērnam konstatē HBoV1 izraisītu smagu pneimoniju (Krakau et

al. 2015). Citā pētījumā, 20 mēnešus vecai meitei konstatē smagu bronholītu, kura izraisīšanā vaino HBoV1 infekciju (Ursic et al. 2011). Ziņots par HBoV1 infekcijas saistību ar akūtu sēkšanu četrus gadus vecai meitei (Edner et al. 2012). Somijā veiktā pētījumā, smagu pneimonijas gadījumu 16 mēnešus vecam zēnam asociē ar HBoV1 infekciju (Jula et al. 2013).

Pētījumu rezultāti rāda, ka HBoV1 ir spējīgs izraisīt elpceļu slimības. Tomēr bieži novēro koinfekciju ar citiem respiratorajiem vīrusiem, kā arī HBoV1 atrod asimptomātiskiem pacientiem, kas HBoV1 lomu elpceļu slimību patogēnēzē padara neskaidru (Debiaggi et al. 2012; Jartti et al. 2012).

### **1.8. HBoV1-4 saistība ar gastroenterītu**

Zināms, ka dzīvnieku bokavīrusi izraisa kuņģa-zarnu trakta slimības dzīvniekiem (Bodewes et al. 2014; Oshima et al. 2010), kas norāda uz HBoV iespējamo saistību ar gastroenterīta izraisīšanu cilvēkiem. 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).

Vairākos pētījumos teikts, ka HBoV klātbūtni detektē fēču paraugos bērniem ar akūtu gastroenterītu (Arthur et al. 2009; Lee et al. 2007; Campe et al. 2008; Lasure and Gopalkrishna 2016). Nereti gastroenterīta gadījumā novēro HBoV koinfekciju ar citiem kuņģa-zarnu trakta patogēniem (Vicente et al. 2007; Lau et al. 2007; Yu et al. 2008; Campe et al. 2008). HBoV koinfekcijas sastopamību vienlaicīgi ar citiem gastroenterītu izraisošiem vīrusiem, (Cheng et al. 2008). Savukārt, citā pētījumā, nekonstatē HBoV koinfekciju ar citiem pārbaudītajiem kuņģa-zarnu trakta vīrusiem, kas norāda uz HBoV saistību ar akūtu gastroenterītu (Levicán et al. 2013).

Konstatēts, ka bērniem ar gastroenterītu, smagākas klīniskās izpausmes ir HBoV2 infekcijas gadījumā, kas seko HBoV1, HBoV3 un HBoV4 infekcijas gadījumi. HBoV2 infekcijas gadījumā konstatētas pat ļoti smagas klīniskās izpausmes (Lasure and Gopalkrishna 2016).

## 1.9. HBoV un citas slimības

HBoV tiek saistīts ne tikai ar elpceļu slimību un gastroenterīta izraisīšanu. Lai gan pagaidām vēl nav veikts liels skaits pētījumu, tomēr atsevišķu pētījumu rezultāti norāda uz HBoV saistību arī ar citām slimībām.

Balstoties uz zināšanām par citiem parvovīrusiem, zinātnieki ir izvirzījuši hipotēzi, ka HBoV var replicēties dažāda veida audos un persistēt tajos pat vairākus gadus, tādējādi izraisot slimības (Schildgen et al. 2012).

Ir veikti vairāki pētījumi, kuros HBoV atrasts CSF paraugos, kas ņemti no pacientiem ar encefalītu. Kādā pētījumā, kas veikts Bangladešā, HBoV1-2 klātbūtni organismā konstatēja četriem no 79 (5,06%) bērniem ar encefalītu, no kuriem divi nomira. Šiem diviem bērniem HBoV bija vienīgais detektētais vīruss CSF paraugā un raksta autori uzskata, ka HBoV ir iesaistīts encefalīta izraisīšanā, kaut gan plašāki pētījumi būtu nepieciešami, lai par to pārliecinātos pilnībā (Mitui et al. 2012). Šrilankā veiktā pētījumā, laika posmā no 2009. līdz 2010. gadam, pieciem no 233 (2,15%) pārbaudītajiem pacientiem, izmantojot PQR metodi, detektēja HBoV1-3 klātbūtni CSF paraugā. Starp šiem pieciem pacientiem bija gan pieaugušie, gan bērni. Pētījuma autori uzskata, ka HBoV varētu būt potenciāls pārvarēt hematoencefālisko barjeru, jo vairākos pētījumos ir konstatēta HBoV virēmija, kas nozīmē, ka vīruss cirkulē asinsritē (Mori et al. 2013). Arī Ķīnā HBoV ir atrasts 10 no 67 (14,93%) CSF paraugiem, kas iegūti no bērniem ar encefalītu. HBoV pozitīvos paraugus sekvencēja, un rezultāti parādīja, ka deviņiem pacientiem konstatēta HBoV1 klātbūtne, bet vienam – HBoV2 (Yu et al. 2013).

Literatūrā aprakstīts gadījums, kad fatālu subakūtu miokardītu saista ar HBoV2 infekciju. Gadījums konstatēts 2013. gadā Viči pilsētā, Francijā, kad astoņas stundas pēc uzņemšanas slimnīcā, mira 13 mēnešus veca meitene. Izmantojot PQR metodi, HBoV2 genoms tika konstatēts deguna uztriepju, urīna, asins plazmas, vēdera dobuma šķidrums, apzarņa mezgla, skeleta muskuļu un plaušu audu paraugos. Autori uzskata, ka HBoV ir jāapsver kā iespējams etioloģiskais aģents zīdaiņu pēkšņās nāves sindroma (ZPNS) un virāla miokardīta gadījumā bērniem (Brebion et al. 2014).

Salīdzinoši nesen veikts pētījums, kurā HBoV atrod pacientiem ar plaušu vai kolorektālo audzēju. Zinātniece *Verena Schildgen* ar kolēģiem, izmantojot PQR metodi, HBoV konstatēja 11 no 60 (18,3%) plaušu un 9 no 44 (20,5%) kolorektālā audzēja audu paraugos. Ņemot vērā, ka citi parvovīrusi spēj integrēties saimniekorganisma genomā, un parvovīruss B19 tiek asociēts ar dažādu audzēju, tostarp, limfomas, sēklinieku audzēja, papillārās un anaplastiskās vairogdziedzera karcinomas, kā arī vairāku hronisku iekaisumu

slimību, piemēram, Hašimoto tireoidīta, kardiomiopātijas un miokardīta izraisīšanu, autori uzskata, ka HBoV varētu būt līdzīgs patoģenēzes mehānisms (Schildgen et al. 2013).

### 1.10. HBoV un koinfekcijas

HBoV infekcijas gadījumā bieži konstatē koinfekciju ar citiem patogēniem, kas var sasniegt pat 100% (Jartti et al. 2012).

HBoV1 var veidot koinfekciju ar citiem respiratorajiem vīrusiem, tādiem kā respiratori sincitiālais vīruss (RSV), cilvēka rinovīruss (HRV), cilvēka enterovīruss (HEV), A un B tipa gripas vīrusi (FluA, FluB), cilvēka metapneimovīruss (MPV), koronavīruss (CoV), paragripas vīruss (PIV) un adenovīruss (AdV), kā arī ar baktērijām, kā *Streptococcus spp* un *Mycoplasma pneumoniae* (Debiaggi et al. 2012; Pinky and Dobrovolny et al. 2016).

ASV veiktā pētījumā, 72% no 106 HBoV1 infekcijas gadījumiem, konstatē koinfekciju ar tādiem respiratorajiem vīrusiem, kā gripas vīruss, MPV, RSV, PIV, CoV, AdV un HRV (Martin et al. 2010). Pētījumā, kas veikts Kenijā, NFA uztriepju paraugos no pacientiem ar elpceļu slimībām, konstatēta HBoV1 koinfekcija ar trešā tipa paragripas vīrusu (PIV3), AdV, HEV un herpes simpleksa vīrusu (HSV) (Misigo et al. 2014). Kādā citā pētījumā, konstatē HBoV1 koinfekciju ar RSV, HRV, FluA, FluB AdV un koronavīrusu OC43. Šajā pašā pētījumā, HBoV1 atrasts fēču paraugos vienlaicīgi ar citiem kuņģa-zarnu trakta vīrusiem (rotavīruss (ROV) un norovīruss), kā arī ar baktērijām *Salmonella enteritidis* un *Campylobacter jejuni* (Vicente et al. 2007).

HBoV1 koinfekcija ar citiem patogēniem (pārsvarā respiratorajiem vīrusiem) tiek konstatēta diengan bieži, un koinfekciju daudzums svārstās no nulles līdz pat 90% atsevišķos pētījumos (Longtin et al. 2008; Christensen et al. 2008; Miron et al. 2010; Calvo et al. 2015).

Arī pētījumos par HBoV2-4 konstatēta koinfekcija ar citiem patogēniem, lai gan nav veikti daudzi pētījumi par HBoV2-4 un koinfekcijām. (Lasure and Gopalkrishna 2016; ).

### 1.11. HBoV transmisija

HBoV transmisijas ceļš nav izpētīts. Tomēr, ņemot vērā, ka inficēšanās ar parvovīrusiem parasti notiek gaisa pilienu ceļā vai nonākot saskarsmē ar inficētām krēpām, fēcēm vai urīnu, uzskata, ka HBoV arī izplatās šādā veidā. To pamato fakts, ka HBoV DNS

atrod dažāda veida paraugos (Jartti et al. 2012). Ir maz ticams, ka bērna inficēšanās ar HBoV varētu notikt grūtniecības laikā, jo topošajām māmiņām novēro augstu imunitātes līmeni (Enders et al. 2009; Riipinen et al. 2010).

### 1.12. HBoV1 patoģenēze un mērķa orgāni

Kaut arī HBoV saista ar slimību izraisīšanu, tomēr joprojām nav skaidri zināms HBoV patoģenēzes mehānisms (Chiu et al. 2014). Turklāt nav pieejami HBoV dzīvnieku modeļi un labi izstrādāti *in vitro* modeļi (Jartti et al. 2012), kaut arī, HBoV1 ir kultivēts elpceļu epitēlija šūnu kultūrās (Deng et al. 2016; Dijkman et al. 2009). Šo pētījumu rezultāti, kā arī HBoV1 genoma sekvenču, kas iegūtas no klīniskajiem paraugiem, analizēšana norāda, ka HBoV1 varētu būt līdzīgs, bet ne identisks replikācijas mehānisms kā citiem parvovīrusiem (Lüsebrink et al. 2011). Pašreizējās zināšanas apgalvo, ka parvovīrusu genoms replicējas ar terminālo „matadatu” struktūru palīdzību, izmantojot „*rolling-hairpin*” modeli, kas ir klasiskā „*rolling-circle*” replikācijas mehānisma atvasinājums (Schildgen et al. 2012).

Rezultāti vairākos pētījumos, kuros pētīta HBoV1 siastība ar tādām dziļāko elpceļu slimībām, kā pneimonija, akūta sēkšana, astma un akūts bronhiolīts, norāda, ka HBoV1 ir spējīgs inficēt dziļākos elpceļus līdz bronhiolām (Allander et al. 2007; Fry et al. 2007; Lüsebrink et al. 2011; Kesebir et al. 2006).

HBoV1 DNS detektēšana seruma paraugos, norāda, ka HBoV1 spēj izraisīt sistēmisku infekciju. Kā arī, vairāku pētījumu autori uzskata, ka HBoV1 virēmija ir sastopama vidēji smagas līdz smagas elpceļu slimības gadījumā, kā arī leicina par akūtu primāru HBoV1 infekciju.

Vairāku pētījumu rezultāti norāda uz HBoV1 iesaisti elpceļu slimību patoģenēzē. Literatūrā aprakstīti gadījumi, kad HBoV1 DNS ir konstatēta pacientam ar smagu elpceļu slimību. Turklāt šajos pētījumos nav konstatēta citu respiratoro patogēnu (vīrusu, baktēriju un sēņu) klātbūtne testētajos paraugos. Šiem pacientiem konstatēja augstu HBoV1 slodzi slimības uzliesmojuma periodā, kas strauji pazeminājās, slimības simptomiem samazinoties (Julia et al. 2013; Ender et al. 2012; Ursic et al. 2011).

HBoV1 klātbūtne fēču paraugos, varētu būt izskaidrojama ar to, ka HBoV1 nokļūst kuņģa-zarnu traktā, vīrusu norijot. Tas arī izskaidro, ievērojami zemāku HBoV1 DNS daudzumu fēču paraugos salīdzinājumā ar elpceļu paraugiem (Arthur et al 2009).

Par to, ka HBoV2-4 varētu būt iesaistīts kuņģa-zarnu trakta slimību patoģenēzē, norāda tas, ka vīrusi tiek konstatēti pārsvarā tikai fēču paraugos (Jartti et al. 2012).

### 1.13. HBoV persistence

Ir pierādīts, ka B19 un AAV cilvēka organismā dažāda veida audos var persistēt dekādēm ilgi. Pastāv vairākas versijas par persistences mehānismu audos. Viena no versijām ir, ka vīrusa DNS integrējas cilvēka hromosomās vai uzglabājas episomu formā. Vai arī vīrusa virions varētu būt piestiprinājies uz folikulāro dendrītisko šūnu virsmas, vai nogādāts audos, atrodoties makrofāgu vai citu cirkulējošo šūnu iekšpusē. HBoV1 DNS var būt detektējams elpceļos vairākus mēnešus pēc akūtas infekcijas. Kaut arī HBoV var izraisīt sistēmisku infekciju, visticamāk, ka HBoV persistences vieta cilvēka organismā ir elpceļš vai kuņģa-zarnu trakts (Schildgen et al. 2012).

HBoV3 DNS ir atrasts episomālā formā līkumainajā zarnā bērnam ar kuņģa-zarnu trakta infekciju (Kapoor et al. 2011). Kā arī ir ziņots par HBoV2 episomu atradni fēču paraugā no bērna ar akūtu caureju (Zhao et al. 2012).

Veikti pētījumi, kuros HBoV1 DNS ir detektēts elpceļos pat vairākus mēnešus pēc primāras HBoV1 identificēšanas, kas norāda uz HBoV1 spēju persistēt elpceļos. Pētījumā, kas veikts Dānijā, 25% no 228 imūnkompetentiem bērniem, izmantojot PĶR metodi, HBoV1 DNS bija detektējams vēl divus mēnešus pēc sākotnējās HBoV1 identificēšanas (Linstow et al. 2008). Kādā pētījumā Somijā, HBoV1 DNS bija detektējams trīs un pat sešus mēnešus pēc primāras HBoV1 konstatēšanas bērniem ar vidusauss iekaisumu (Lehtoranta 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. Visu pacientu vecāki vai aizbildņi deva rakstisku piekrišanu dalībai pētījumā.

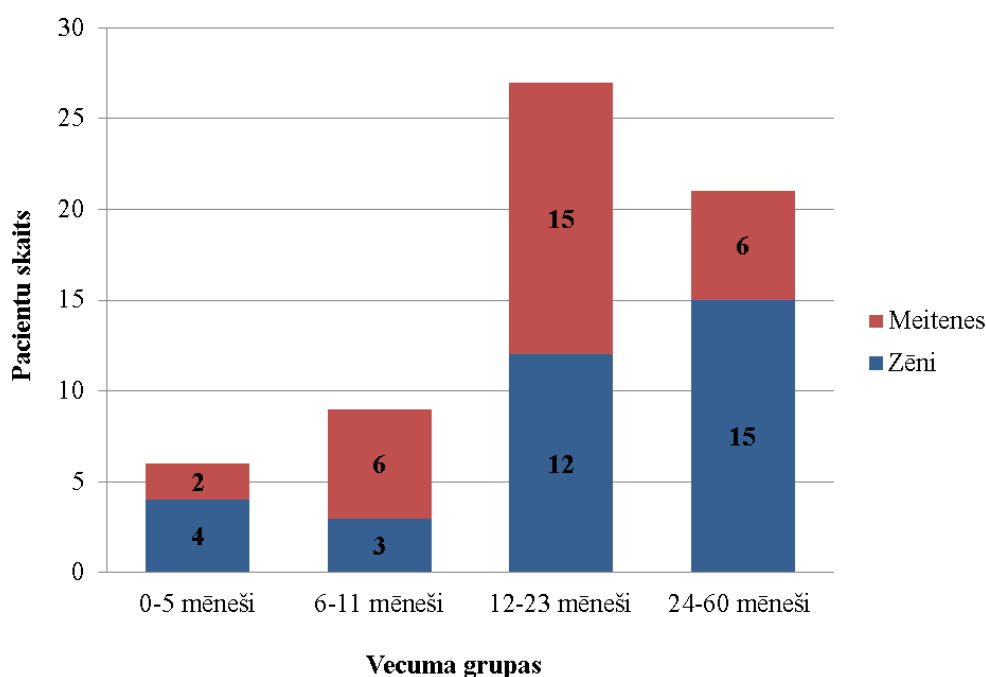
Pētījumā iekļauti bērni vecumā no viena līdz 60 mēnešiem, kuri stacionēti VSIA Bērnu Klīniskās universitātes slimnīcā ar neprecizētas etioloģijas dziļāko elpceļu slimību vai akūtu gastroenterītu, laika posmā no 2013. gada oktobra līdz 2016. gada maijam.

Pētījumā iekļauti 63 pacienti [29 (46%) meitenes un 34 (54%) zēni, vidējais vecums 20 ( $\pm 11,7$ ) mēneši (no 2 līdz 52 mēnešiem)] ar dziļāko elpceļu slimībām. Dziļāko elpceļu infekciju apstiprināja ārsts, balstoties uz pacienta klīniskajiem simptomiem vai pēc plaušu rentgenogrammas. Saskaņā ar D. E. Roth et al. 2008., lai pieņemtu, ka pacientam ir dziļāko elpceļu infekcija, pacientam jāizpaužas vismaz vienai no klīniskajām izpausmēm: ātra vai paātrināta elpošana, elpošanai izmantota palīgmuskulatūra, konstatēta patoloģiska auskultstīvā atradne (mitri trokšņi/krepitācija vai sausi trokšņi). Ātru vai paātrinātu elpošanu definēja atbilstoši Pasaules Veselības organizācijas (PVO) kritērijiem: bērniem, kas jaunāki par diviem mēnešiem elpošanas ātrums  $>60$  min; vecumā no diviem līdz 12 mēnešiem elpošanas ātrums  $>50$  min; vecumā no 12 līdz 60 mēnešiem elpošanas ātrums  $>40$  min (WHO, 1995). Visiem pacientiem, paraugu ņemšanas brīdī, bija drudzis ( $T > 38^{\circ}\text{C}$ ). Slimnīcā pacientiem noteikts C reaktīvā olbaltuma (CRO) līmenis un leukocītu skaits asinīs, kas ir nespecifiski iekaisuma rādītāji, pēc kuriem var spriest par virālu vai bakteriālu infekciju. Augsts CRO līmenis ( $>100$  mg/L) un liels leukocītu skaits asinīs norāda uz bakteriālu infekciju. 53 pacientiem, izmantojot imūnfluorescences metodi, noteikta RSV, AdV, PIV, FluA un FluB klātbūtne nazofaringeālās iztriepes (NFI) paraugā. Visiem pacientiem, kuriem klīniski diagnosticēta pneimonija, veikts bakteriālais asins uzsējums. Pacienti tika sadalīti četrās vecuma grupās: 1. grupa (0 līdz 5 mēneši), 2. grupa (6 līdz 11 mēneši), 3. grupa (12 līdz 23 mēneši) un 4. grupa (24 līdz 60 mēneši). Pacientu skaitliskais sadalījums pa grupām: 1. grupa - 6 (9,5%), 2. grupa - 9 (14,3%), 3. grupa - 27 (42,8%), 4. grupa - 21 (33,4%) (4. att.). Noteikts, ka starp pacientu grupām, ņemot vērā pacienta dzimumu un vecumu, nav statistiski nozīmīgas atšķirības ( $p=0,1287$ ).

Pētījumā iekļauti 36 pacienti [12 (33%) meitenes un 24 (67%) zēni, vidējais vecums 15 ( $\pm 10,3$ ) mēneši (no 1 līdz 40 mēnešiem)] ar akūtu gastroenterītu. Pētījumā iekļāva pacientus, kuri atbilda šādiem iekļaušanas kritērijiem: vecums līdz 5 gadiem; pacientam novērojami akūta gastroenterīta simptomi (caureja ar vai bez vemšanas un drudža). Pētījumā netika

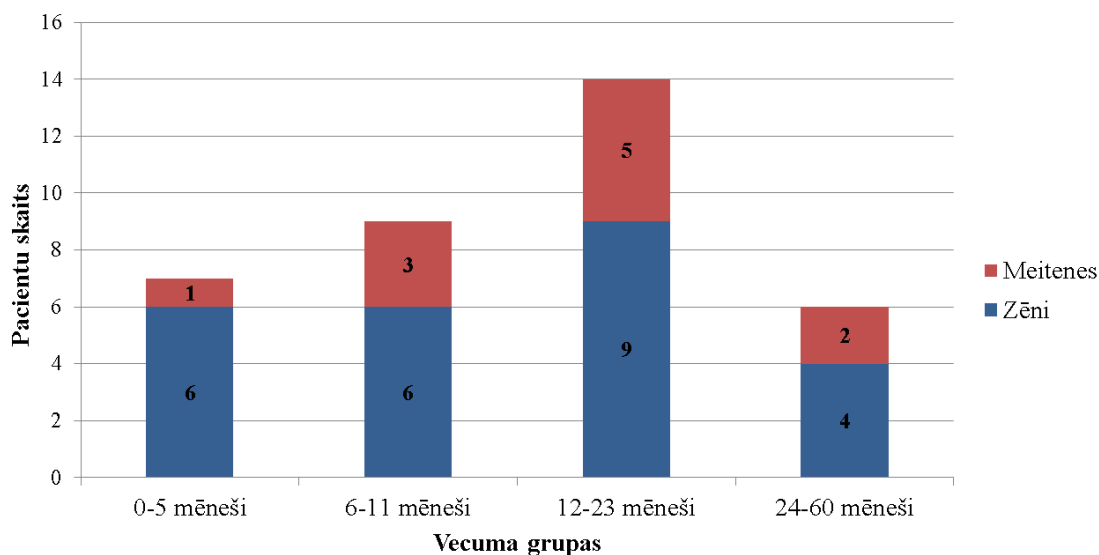
iekļauti pacienti ar smagām hroniskām slimībām un pacienti, kuriem stacionēšanās brīdī noteikts bakteriālas izcelsmes gastroenterīts. Visiem pacientiem veikts bakteriālais fēču uzsējums, lai noteiktu *Shigella* un *Salmonella* ģints baktēriju klātbūtni organismā. Paraugu ņemšanas brīdī, 32 pacientiem bija drudzis ( $T > 38^{\circ}\text{C}$ ). Pacienti tika sadalīti četrās vecuma grupās (0 līdz 5 mēneši; 6 līdz 11 mēneši; 12 līdz 23 mēneši; 24 līdz 60 mēneši). Pacientu skaitliskais sadalījums pa vecuma grupām: 1. grupa – 7 (19,4%), 2. grupa – 9 (25,0%), 3. grupa – 14 (38,9%), 4. grupa – 6 (16,7%) (5. att.). Noteikts, ka starp pacientu grupām, ņemot vērā vecumu un dzimumu, nav statistiski nozīmīgas atšķirības ( $p=0,6338$ ).

Sertificēts medicīnas personāls, atbilstoši standartizētam protokolam, paņēma perifēro asiņu un nazofaringeālo aspirātu (NFA) paraugus no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām; perifēro asiņu un fēču paraugus no pacientiem ar akūtu gastroenterītu. Klīnisko materiālu nogādāja RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta laboratorijā virusoloģiskiem un imunoloģiskiem izmeklējumiem. Plazmas parauga alikvotu nogādāja uz Hedmana institūtu Helsinkos (Somija) HBoV1-4 tipu specifiskai seroloģiskai analīzei.



4. attēls. Pacientu, ar dziļāko elpceļu slimībām, sadalījums četrās vecuma grupās.

Figure 4. Division of patients with lower respiratory tract diseases in four age groups.



5. attēls. Pacientu, ar akūtu gastroenterītu, sadalījums četrās vecuma grupās.  
 Figure 5. Division of patients with acute gastroenteritis in four age groups.

## 2.2. DNS izdalīšana no NFA, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas

DNS izdalīšanai izmantoja 500 µl perifēro asiņu, 200 µl no šūnām brīvas asins plazmas un 200 µl NFA. Lai atdalītu asins plazmu no perifērajām asinīm, izmantoja centrifugēšanas metodi. Pirms DNS izdalīšanas, veica asiņu un NFA paraugu apstrādi ar lizējošo buferi, lai sagrautu šūnu membrānas. DNS no šūnām brīvas asins plazmas, perifērajām asinīm un NFA izdalīja, izmantojot fenola-hloroforma metodi, vadoties pēc standartizēta protokola. Iegūto DNS paraugu īslaicīgi (līdz vienai nedēļai) glabāja +4°C, bet ilgstoši -20°C temperatūrā.

## 2.3. DNS izdalīšana no fēcēm

DNS no fēcēm izdalīja ar kolonnu metodi, izmantojot firmas *Qiagen* komerciāli pieejamu DNS izdalīšanas komplektu (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*), atbilstoši ražotāja instrukcijām. DNS izdalīšanai izmantoja ~200 mg sasaldētu fēcju. DNS paraugu īslaicīgi glabāja +4°C, bet ilgstoši -20°C temperatūrā.

## 2.4. RNS izdalīšana no PBMC

RNS izdalīja no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām (PBMC), kas iegūtas izmantojot standarta fikola gradienta metodi, kurām pievienoja 500 µl Tri - Reaģentu šūnu lizēšanai un 200 µl hloroforma. Paraugu maisīja 15 s un inkubēja 15 min istabas temperatūrā. Tad paraugu centrifugēja 12000g 15 min +4°C temperatūrā, supernatantu pārnesa jaunā stobriņā un pievienoja 250 µl izopropanola. Paraugu samaisīja un inkubēja 10 min. istabas temperatūrā, centrifugēja 12000g 8 min +4°C temperatūrā. Nolēja supernatantu un nogulsnēm pievienoja 1 ml ledusaukstu 75% etanolu, paraugu samaisīja un centrifugēja 7500g 5 min +4°C temperatūrā. Nolēja etanolu un RNS žāvēja trīs līdz piecas min istabas temperatūrā, tad RNS šķīdināja, pievienojot 30 µl ar dietilpirokarbonātu (DEPC) apstrādātu ūdeni. RNS glabāja -80°C temperatūrā. Iegūto RNS apstrādāja ar dezoksiribonukleāzi (DNāzi) (*Turbo DNA-free, Ambion, Life Technologies*).

## 2.5. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana

Nukleīnskābju daudzumu noteica, izmantojot „*NanoDrop*” spektrofotometru, kas mēra šķidrums elektromagnētisko spraigumu. Lietojot programmu *ND1000*, noteica DNS un RNS koncentrāciju (ng/µl) 260 nm viļņu garumā. Nukleīnskābju tīrību parāda attiecība 260/280, kas tīrai DNS ir 1,8, bet RNS 2,0.

## 2.6. kDNS sintezēšana

Komplementāro DNS (kDNS) no RNS sintezēja ar reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakciju (RT-PĶR), izmantojot komerciāli pieejamu, firmas *Thermo Scientific*, kDNS sintēzes komplektu (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*). kDNS sintēzi veica atbilstoši ražotāja protokolam. kDNS paraugu glabāja -80°C temperatūrā.

## 2.7. DNS un kDNS kvalitātes pārbaude

Iegūtās DNS un kDNS kvalitāti noteica ar PĶR, nosakot β-globīna gēna sekvenču klātbūtni tajā. DNS, kas izdalīta no pilnām asinīm, NFA un fēcēm, un kDNS, kas iegūta no

PBMC, uzskatīja par kvalitatīvu, ja PĶR produktā konstatēja  $\beta$ -globīna gēna sekvenses klātbūtni. Par kvalitatīvu DNS, kas izdalīta no asins plazmas, uzskatīja, ja PĶR produktā netika konstatēta  $\beta$ -globīna gēna sekvenses klātbūtne, kas norāda uz to, ka nav notikusi kontaminācija ar šūnu DNS.  $\beta$ -globīna gēna sekvenses klātbūtni noteica ar praimeriem:

GS268 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

GS269 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'

25  $\mu$  PĶR amplifikācijas maisījuma pagatavošanai vienam paraugam izmantoja:

- 2,5  $\mu$ l 10x PĶR buferi;
- 2  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$ ;
- 0,5  $\mu$ l 10 mM dNTP;
- 0,1  $\mu$ l 100  $\mu$ M GS268 praimeris;
- 0,1  $\mu$ l 100  $\mu$ M GS269 praimeris;
- 0,1  $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq polimerāzi;
- 17,7  $\mu$ l molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 2  $\mu$ 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.

Amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gēlā. PĶR produkta izmērs bija 200 bp.

## 2.8. HBoV1 genoma sekvenses noteikšana ar PĶR

Pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām noteica HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni organismā. HBoV1 NS1 gēna sekvenses noteikšanai DNS paraugā, kas izdalīts no asins plazmas, perifērajām asinīm un NFA izmantoja PĶR metodi. Lai pārliecinātos, ka reakcijas laikā nav notikusi kontaminācija, izmantoja ūdens kontroli pēc katriem pieciem paraugiem.

PĶR veica saskaņā ar T. P. Sloots et al. 2006. HBoV1 genoma sekvences noteikšanu veica ar HBoV01.2. un HBoV02.2. praimeru komplektu, kas komplementāri HBoV1 NS1 gēnam:

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 MgCl<sub>2</sub>;
- 0,5 µl 10 mM dNTP;
- 0,2 µl 100 µM HBoV01.2. praimeris;
- 0,2 µl 100 µM HBoV02.2. praimeris;
- 0,2 µl 5U/µl Taq polimerāzi;
- 38,9 µl molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 2 µl DNS paraugu (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 reakcijā izmantoja HBoV1 plazmīdu (dāvinājums no *Prof. Hsin-Fu Liu, Department of Medical Research, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taivan*) Amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gelā. Paredzamais PĶR produkta izmērs bija 300 bp.

## **2.9. HBoV1 genoma sekvences noteikšana kDNS paraugos ar PĶR**

kDNS paraugos, kas iegūti no PBMC, no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, HBoV1 NP1 gēna sekvences klātbūtni noteica ar preimeriem, kas paredzēti HBoV1 noteikšanai kDNS paraugos, saskaņā ar A. Christensen et al. 2013., izmantojot praimerus:

F: 5'-CGGCGAGTGAACATCTCTGGA-3'

R: 5'-TGCTTGTCTTTCATATCCCT-3'

50 µl PĶR amplifikācijas maisījuma pagatavošanai vienam paraugam izmantoja:

- 5 µl 10x PĶR buferi;
- 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>;
- 0,5 µl 10 mM dNTP;
- 0,2 µl 100 µM *forward* praimeris;
- 0,2 µl 100 µM *reverse* praimeris;
- 0,2 µl 5U/µl Taq polimerāzi;
- 38,9 µl molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 2 µl kDNS paraugu.

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 15 min 95°C;

Amplifikācija (45 cikli):

1. DNS denaturācija – 5 s 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 10 s 55°C;
3. DNS sintēze – 20 s 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 15 min 72°C;

Uzglabāšana - +4°C.

Iegūtos amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gēlā, paredzamais amplifikācijas produkta izmērs bija 242 bp.

## 2.10. HBoV1-4 genoma sekvens noteikšana paraugos ar nPĶR

Pacientiem ar akūtu gastroenterītu veica HBoV1-4 VP1/VP2 gēna sekvens noteikšanu DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas. nPĶR veica saskaņā ar A. Kapoor et al. 2010. nPĶR izmantoja praimeru kompleksus AK-VP-F1/AK-VP-R1 un AK-VP-F2/AK-VP-R2, kas komplementāri HBoV1-4 VP1/VP2 gēnu sekvencei. Praimeri paredzēti HBoV1-4 detektēšanai DNS paraugā.

1. cikls: AK-VP-F1: 5` - CGCCGTGGCTCCTGCTCT – 3`  
AK-VP-R1: 5` - TGTTGCGCCATCACAAAAGATGTG – 3`
2. cikls: AK-VP-F2: 5` - GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAAGAG – 3`  
AK-VP-R2: 5` - CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTATGT – 3`

nPĶR amplifikācijas pirmā cikla maisījuma pagatavošanai (50 µl) vienam paraugam izmantoja:

- 5 µl PĶR buferi;
- 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>;
- 0,5 µl 10 mM dNTP;
- 0,2 µl AK-VP-F1 praimeris;
- 0,2 µl AK-VP-R1 praimeris;
- 0,2 µl 5U/µl Taq polimerāzi;
- 35,9 µl molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 5 µl DNS paraugu.

Reakcijas apstākļi;

Sākotnējā denaturācija – 15 min 95°C;

Amplifikācija (10 cikli):

1. DNS denaturācija - 35 s 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 1 min 58°C (temperatūras pazemināšanās par 0,5°C, katrā ciklā);
3. DNS sintēze – 1 min 72°C;

Amplifikācija (30 cikli):

1. DNS denaturācija – 30 s 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 45 s 54°C;
3. DNS sintēze – 45 s 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 10 min 72°C;

Uzglabāšana - +4°C.

Otrā cikla PĶR maisījuma (50 µl) pagatavošanai vienam paraugam izmantoja, tos pašus reaģentus, ko pirmā cikla maisījumam, izmantojot otrajam nPĶR ciklam paredzēto praimeru pāri (AK-VP-F2 un AK-VP-R2).

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 15 min 95°C;

Amplifikācija (10 cikli):

1. DNS denaturācija – 35 s 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 1 min 60°C (temperatūras pazemināšanās par 0,5°C, katrā ciklā);
3. DNS sintēze – 1 min 72°C;

Amplifikācija (30 cikli):

1. DNS denaturācija – 30 s 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 45 s 58°C;
3. DNS sintēze – 45 s 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 10 min 72°C;

Uzglabāšana - +4°C.

Par pozitīvo kontroli izmantoja HBoV2, HBoV3 un HBoV4 plazmīdas (dāvinājums no *Prof. Maria Söderlund-Venermo, Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki, Finland*). Amplifikācijas produktus analizēja agarozes gēlā. Paredzētais nPQR amplifikācijas produkta izmērs bija 575 bp. Pacienti ar akūtu gastroenterītu neveica HBoV mRNS noteikšanu PBMC paraugos, jo nevienam no pacientiem nekonstatēja HBoV klātbūtni DNS paraugā, kas izdalīts no perifērajām asinīm.

## 2.11. Elektroforēze

PQR amplifikācijas produktus analizēja elektroforētiski agarozes gēlā. Ar elektroforēzes metodi DNS un kDNS fragmenti tiek sadalīti un identificēti atkarībā no to garuma. Lai noteiktu amplifikācijas produkta izmēru (bp), izmantoja marķierus *pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23* un *GeneRuler 100 bp*. Iegūtos rezultātus vizualizēja, izmantojot iekārtu *BioSpectrum MultiSpectral Imaging System*.

## 2.12. Paraugu sagatavošana sekvencēšanai

DNS paraugus, kuros konstatēja HBoV genoma sekvences klātbūtni, sekvencēja, lai pārliicinātos par to, kāds HBoV tips detektēts paraugā.

### 2.12.1. PQR amplikonu attīrīšana

PQR amplikonu attīrīšanu veica ar *Qiagen* firmas komplektu (*MinElute PCR Purification Kit*), atbilstoši ražotāja instrukcijām. Attīrīšanai izmantoja 40 µl PQR amplifikācijas produkta. Attīrīto PQR amplifikācijas produktu īslaicīgi glabāja +4°C temperatūrā, bet ilgstoši -20°C temperatūrā.

### 2.12.2. PĶR amplikonu ekstrakcija no gēla

PĶR amplifikācijas produktu ekstrakciju no agarozes gēla veica ar firmas *Life Technologies* darba komplektu (*PureLink Quick Gel Extraction Kit*), atbilstoši ražotāja instrukcijām. Attīrīto PĶR amplifikācijas produktu īslaicīgi glabāja +4°C, bet ilgstoši -20°C temperatūrā.

### 2.12.3. Klonēšanas PĶR

Lai sagatavotu paraugus sekvencēšanai, veica HBoV V1/V2 gēnu sekvences klonēšanu ar *forvardo* vai *reverso* praimeru, izmantojot *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* komplektu (Applied Biosystems, ASV). HBoV VP1/VP2 gēnu sekvences klonēšanas PĶR veica ar praimeru AK-VP-F2 vai AK-VP-R2.

20 µl PĶR amplifikācijas maisījuma pagatavošanai vienam paraugam izmantoja:

- 4 µl BigDye sekvencēšanas buferi (*BigDye Sequencing Buffer*);
- 2 µl BigDye;
- 1 µl 3,2 µM AK-VP-F2 vai AK-VP-R2 praimeru;
- 12 µl molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni;
- 1 µl DNS paraugu (5-20 ng/reakcijā).

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 1 min 96°C;

Amplifiācija (25 cikli):

1. DNS denaturācija – 10 s 96°C;
2. Praimeru hibridizācija – 5 s 50°C;
3. DNS sintēze – 4 min 60°C;

Uzglabāšana - +4°C.

Amplifikācijas produktu attīrīšanu un sekvencēšanu veica Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC). Iegūtos sekvencēšanas rezultātus analizēja datorprogrammā *Chromas 2.5.1.* un iegūtās nukleotīdu sekvences salīdzināja ar *BLASTN* datubāzē esošajām sekvencēm.

### 2.13. HBoV slodze noteikšana ar qPĶR

HBoV slodzes noteikšanai paraugos, izmantoja kvantitatīvo PĶR (qPĶR) metodi, lietojot firmas *Primerdesign* komerciāli pieejamu komplektu (*Real-time PCR detection kit for Human Bocavirus genomes*), atbilstoši ražotāja protokolam. Reālā laika PĶR veica, izmantojot iekārtu *CFX96 Deep Well Real-Time Detection System* (*Bio-Rad, ASV*). Iegūtos rezultātus analizēja datorprogrammā *Bio-Rad CFX Manager*. Vīrusa slodzi paraugos aprēķināja kopijas/mikrogramā DNS.

### 2.14. Koinfekciju noteikšana ar multiplex reālā laika PĶR

Vīrusu noteikšanu DNS paraugos, kas iegūti no NFA vai fēcēm veica ar firmas *Seegene* ražotiem multiplex reālā laika PĶR komplektiem (*Allplex GI-Virus Assay; Allplex Respiratory Panel 1; Allplex Respiratory Panel 2; Allplex Respiratory Panel 3*), atbilstoši ražotāja instrukcijām. Komplekti paredzēti vairāku vīrusu detektēšanai vienā paraugā. Analizēja 44 DNS paraugus, kas iegūti no NFA un 36 DNS paraugus, kas iegūti no fēcēm.

DNS paraugos, kas iegūti no fēcēm noteica šādu vīrusu klātbūtni: norovīrusus GI (NVG1), norovīrusus GII (NVG2), rotavīrusus A (ROV), adenovīrusus F (ADV-F; Serotype 40/41), astrovīrusus (ASV) un sapovīrusus (SV).

DNS paraugos, kas iegūti no NFA, noteica šādu vīrusu klātbūtni: A tipa gripas vīrusus (FluA), B tipa gripas vīrusus (FluB), A tipa respiratori sincitiālais vīrusus (RSVA), B tipa respiratori sincitiālais vīrusus (RSVB), A tipa gripas vīrusa apakštips H1pdm09 (FluA-H1pdm09), A tipa gripas vīrusa apakštips H1 (FluA-H1), A tipa gripas vīrusa apakštips H3 (FluA-H3), adenovīrusus (AdV), enterovīrusus (HEV), pirmā, otrā, trešā un ceturtā tipa paragripas vīrusus (PIV1, PIV2, PIV3, PIV4), metapneimovīrusus (MPV), cilvēka bokavīrusus (HBoV), rinovīrusus (HRV), koronavīrusus 229E (CoV229E), koronavīrusus NL63 (CoVNL63) un koronavīrusus OC43 (CoVOC43).

Multiplex reālā laika PĶR veica, izmantojot iekārtu *CFX96 Deep Well Real-Time Detection System* (*Bio-Rad, ASV*). Iegūtos rezultātus analizēja datorprogrammā *Bio-Rad CFX Manager IVD* un eksportēja datorprogrammā *Seegene Viewer for Real time Instruments v2.0*.

## 2.15. HBoV specifisko IgG un IgM klases antivielu noteikšana

HBoV1-4 specifiskās IgG un IgM klases antivielas plazmā noteica, izmantojot enzīmmunoloģisko analīzi (*Enzyme immunoassay – EIA*), kas izstrādāta Helsinku universitātes Hārtmana institūtā. Seroloģijas testus veica saskaņā ar K. Kantola et al. 2008. Testos par antigēniem izmantoja HBoV vīrusveidīgās daļiņas (VLPs). Nosakot attiecīgā HBoV tipa specifiskās IgG un IgM klases antivielas, veica bloķēšanas reakciju ar pārējo HBoV tipu vīrusveidīgajām daļiņām, lai pārlicinātos, ka nav notikusi krusteniskā reaktivitāte (*cross-reactivity*). Krusteniskā reaktivitāte tika pārbaudīta, jo testā izmantotās HBoV1-4 vīrusveidīgās daļiņas ir savstarpēji ļoti līdzīgas, un pastāv liela krusteniskās reaktivitātes iespējamība. Enzīmmunoloģiskos testus veica kolēģi Helsinku universitātes Hārtmana institūtā.

## 2.16. Citokīnu līmeņa noteikšana

Citokīnu līmenī plazmā noteica ar firmas *R&D systems* ražoto magnētisko daļiņu *Luminex* skrīninga testu (*Magnetic Luminex Screening Assay*), kura pamatā ir multipleksēta sendviča ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) metode. Ar *Luminex* iekārtu ir iespējams analizēt vairāku citokīnu līmeni vienā paraugā. Atšķirībā no parasta ELISA testa, *Luminex* skrīninga testos vienā plates bedrītē ir iespējams analizēt līdz pat 100 analītiem vienlaicīgi. Analizēja citokīnu TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 un IL-13 ekspresijas līmeni. Testu veica atbilstoši ražotāja protokolam. Rezultātus nolasīja ar iekārtu *Luminex 200* un rezultātus analizēja datorprogrammā *xPonent Software solutions*.

## 2.17. Statistikas metodes

Statistisko apstrādi veica datorprogrammā *GraphPad Prism 7*. Darbā izmantoja tādas statistiskās analīzes metodes, kā Hī-kvadrāta kritērijs un Fišera eksaktais tests, Manna-Vitneja U kritērijs. Rezultātus uzskatīja par statistiski nozīmīgiem, ja  $p \leq 0,05$ .

## 2.18. Materiāli

### 2.18.1. Reaģenti

1. tabula  
Reaģenti.  
Table 1  
Reagents.

Reaģents	Receptūra	Ražotājs	Ražotājvalsts
Lizējošais buferis (kopējais tilpums 50 ml)	0,5 ml 1M Tris HCl, pH 7,6	Sigma	ASV
	0,125 ml 2M MgCl <sub>2</sub>	–	–
	0,125 ml 4M NaCl	Sigma	ASV
	Destilēts H <sub>2</sub> O	–	–
Proteināzes K buferis (kopējais tilpums 100 ml)	5,85 g NaCl	–	–
	23,98 ml 0,5M EDTA	Sigma	ASV
	Destilēts H <sub>2</sub> O	–	–
<i>Deoxyribonuclease I (DNase I)</i>	–	Thermo Scientific	Lietuva
10x Taq buferis ar KCl	–	Thermo Scientific	Lietuva
25mM MgCl <sub>2</sub>	–	Thermo Scientific	Lietuva
0,2mM dNTP	–	Thermo Scientific	Lietuva
5U/μl Taq polimerāze <i>DNA Taq Polymerase (recombinant)</i>	–	Thermo Scientific	Lietuva
Agarozē – <i>Top Vision LE GQ Agarose</i>	–	Thermo Scientific	Lietuva
1x Gly elektroforēzes buferis (1L)	10 ml 10x NorthernMax® Gly Gel Prep/Running Buffer	Ambion	ASV
Etīdija bromīds – 1%, 10 mg/ml	–	Appllichem	Vācija

50x TAE elektroforēzes buferis	40 mM Tris	Thermo Scientific	Lietuva
	20 mM acetic acid		
	1 mM EDTA(20 ml 50x TAE, 980 ml destilēts H <sub>2</sub> O)		
6x Loading Dye Solution	10 mM Tris – HCl (pH 7,6) 0,03% Bromophenol blue	Thermo Scientific	Lietuva
	0,03% xylene cyanol FF		
	60% glycerol 60 mM EDTA		
Elektroforēzes marķieris – pUC19DNA/MspI (HpaII) Marker, 23	-	Thermo Scientific	Lietuva
Proteināze K ferments	–	Thermo Scientific	Lietuva
Glikogēns – 20 mg/ml	–	Thermo Scientific	Lietuva
Fenols, pH 8,0	–	USB Corporation	ASV
Hloroforms	–	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
6x Loading Buffer with GelRed	–	GenScript	Ķīna
Molekulārās bioloģijas tūrbas ūdens	–	Sigma	Vācija
96% etanols	–	Enola SIA	Latvija
Elektroforēzes marķieris – GeneRuler 100 bp	-	Thermo Scientific	Lietuva
TURBO DNA-free DNāze	-	Ambion	ASV

## 2.18.2 Aprīkojums

Amplifikators: C1000 Touch Thermal Cycler, Biorad, ASV

Luminex iekārta: Luminex 200, Luminex Corporation, ASV

Reālā laika PĶR aparatūra: CFX96 Deep Well Real-Time Detection System, Biorad, ASV

Spektrofotometrs: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, ASV

Centrifūga: Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Vācija

Centrifūga: Mini Spin "Eppendorf", Vācija

Analītiskie svāri: Kern, Vācija

Līdzstrāvas avots: Biometra Power Pack P25 T, Vācija

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

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

UV transluminators: Biometra TI2, Vācija

Inkubators: Heratherm Incubator, Thermo Scientific, Vācija

Termostats: Cooling-Heating Thermostat, Biosan, Latvija

Kratītājs: Biosan, Latvija

Maisītājs: Vortex Sankine 10897, Biosan, Latvija

Mikroviļņu krāsns: M1712R, SAMSUNG, Koreja

Pipetes: Finnpiquette, Thermo Scientific, Somija

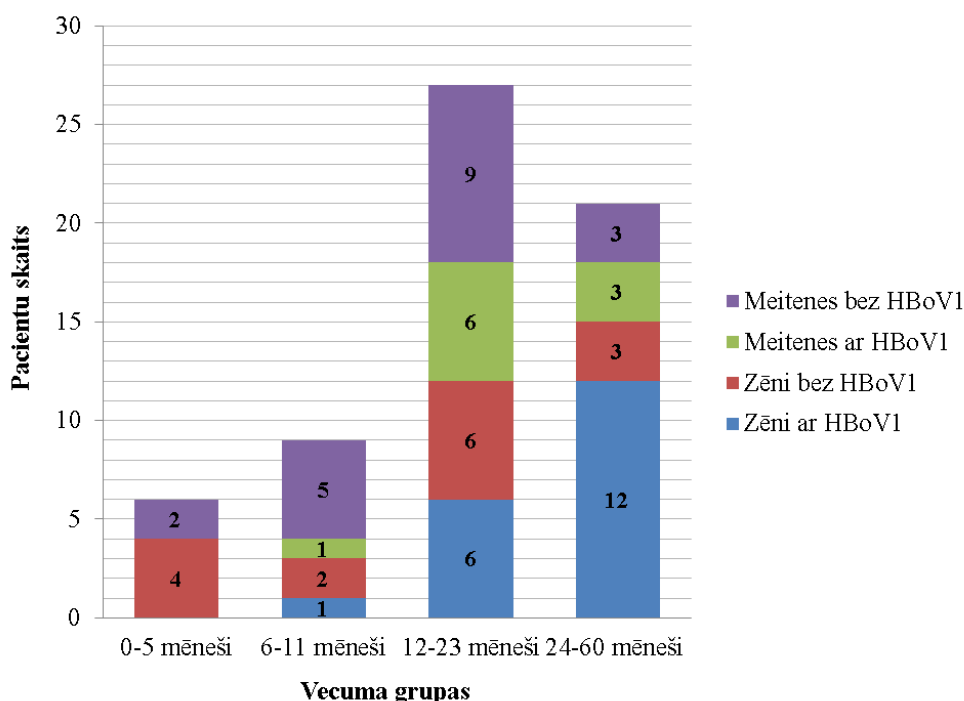
Reakciju stobriņi 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml un 2 ml, uzgaļi ar filtru, uzgaļi bez filtra: Thermo Labsystems, Somija

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

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām

HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtni konstatēja 29 no 63 (46,03%) pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, no tiem 19 (65,52%) zēniem un 10 (34,48%) meitenēm. Pirmajā vecuma grupā (no 0 līdz 5 mēnešiem) nevienam pacientam nekonstatēja HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtni pārbaudītajos DNS paraugos. HBoV1 genoma sekvenses sastopamības sadalījums četrās vecuma grupās pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām parādīts 6. attēlā.

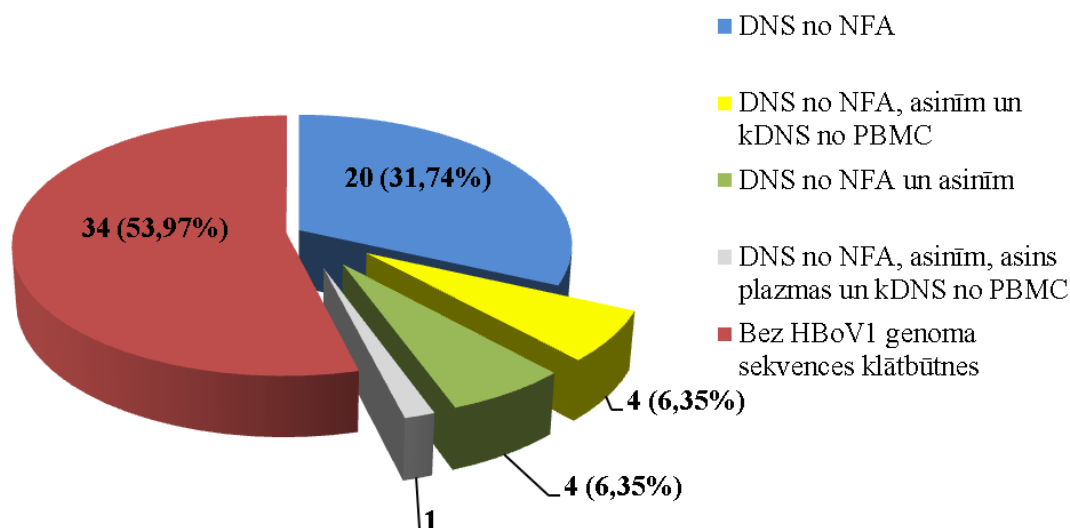


6. attēls. HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtnes sadalījums četrās vecuma grupās pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām.

Figure 6. Distribution of HBoV1 NS1 gene sequence in four age groups of patients with lower respiratory tract diseases.

HBoV1 genoma sekvenci detektēja 29 DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, deviņos DNS paraugos, kas izdalīti no pilnām asinīm un vienā DNS paraugā, kas izdalīts no asins plazmas. Pieciem pacientiem HBoV1 NS1 gēna sekvensi konstatēja kDNS paraugā, kas iegūts no PBMC. Divdesmit pacientiem HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni detektēja tikai DNS paraugā, kas iegūts no NFA. Četriem pacientiem HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtni vienlaicīgi noteica DNS paraugā, kas iegūts no NFA un pilnām asinīm, savukārt četriem

pacienti DNS paraugā, kas izdalīts no NFA, pilnām asinīm un kDNS parauga, kas iegūts no PBMC. HBoV1 NS1 genoma sekvenses klātbūtne DNS paraugos no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām parādīta 7. attēlā.

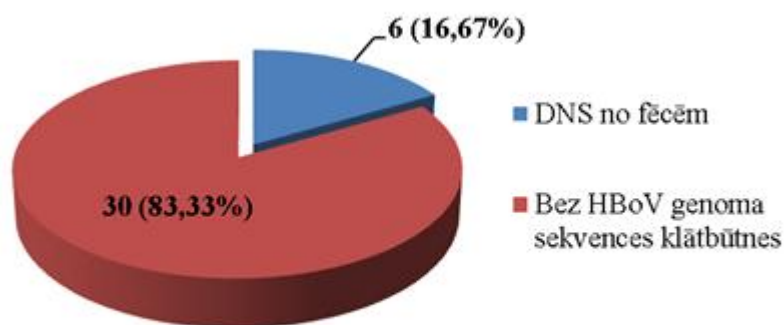


7. attēls. HBoV1 NS1 gēna sekvenses klātbūtne dažādos DNS paraugos pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām.

Figure 7. Presence of HBoV1 NS1 gene sequence in different type DNA samples of patients with lower respiratory tract diseases.

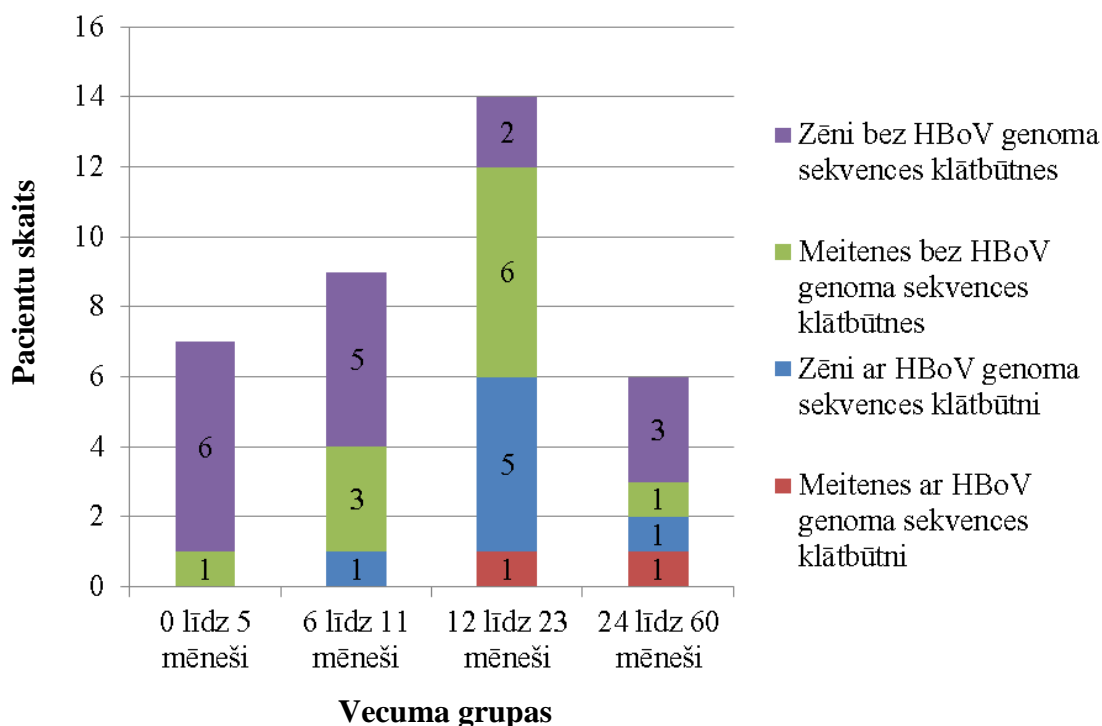
### 3.2. HBoV1-4 VP1/VP2 gēna sekvenses klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu

HBoV1-4 VP1/VP2 gēna sekvenses klātbūtni detektēja sešiem no 36 (16,67%) pacientiem ar akūtu gastroenterītu, no tiem četriem (66,67%) zēniem un divām (33,33%) meitenēm. Visiem sešiem pacientiem HBoV genoma sekvence atrasta DNS, kas izdalīta no fēcēm (8. att.). Nevienam pacientam HBoV genoma sekvenci nedetektēja DNS paraugā, kas izdalīts no perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas. HBoV genoma sekvenses sastopamība bērniem ar akūtu gastroenterītu parādīta 9. attēlā.



8. attēls. HBoV1-4 VP1/VP2 gēnasekvences klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu.

Figure 8. Presence of HBoV1-4 VP1/VP2 gene sequence in patients with acute gastroenteritis.



9. attēls. HBoV VP1/VP2 gēnu sekvences klātbūtnes sadalījums pa vecuma grupām pacientiem ar akūtu gastroenterītu.

Figure 9. Distribution of HBoV VP1/VP2 gene sequence in four age groups of patients with acute gastroenteritis.

### 3.3. Sekvencēšanas rezultāti

DNS paraugus, kuros konstatēja HBoV genoma sekvenses klātbūtni, sekvencēja, lai noteiktu, kāds tieši HBoV tips ir detektēts. Visos DNS paraugos (no NFA, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas), kas iegūti no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, konstatēja HBoV1 klātbūtni.

Piecos fēcū DNS paraugos, kas iegūti no pacientiem ar akūtu gastroenterītu, noteica HBoV2 klātbūtni, bet vienam pacientam – HBoV3 klātbūtni.

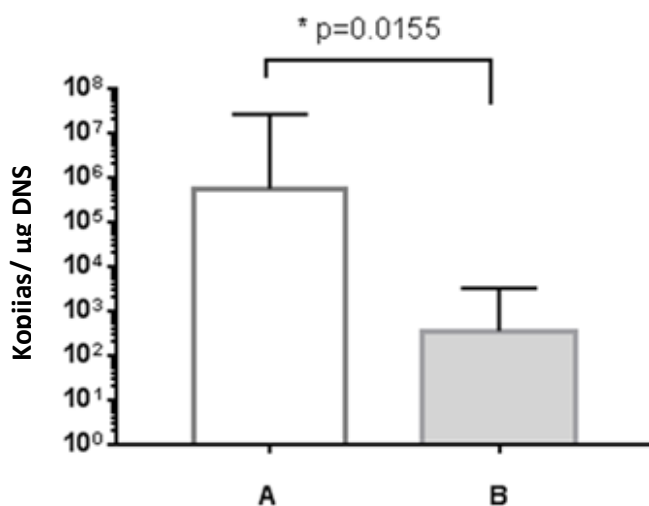
HBoV4 klātbūtne netika konstatēta nevienā no pārbaudītajiem paraugiem.

### 3.4. Vīrusa slodzes noteikšana ar qPĶR

DNS paraugos, kuros konstatēja HBoV genoma sekvenses klātbūtni, noteica vīrusa slodzi, izmantojot qPĶR metodi.

Pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām vidējā HBoV slodze DNS paraugos, kas izdalīti no NFA bija 3236855,66 kopijas/ $\mu$ g DNS (no 84,33 līdz 36094611,00 kopijas/ $\mu$ g DNS). DNS paraugos, kas izdalīti no perifērajām asinīm vidējā HBoV slodze bija 273,95 kopijas/ $\mu$ g DNS (no 17,00 līdz 1127,02 kopijas/ $\mu$ g DNS). HBoV1 pozitīvajā DNS paraugā, kas izdalīts no šūnām brīvas asins plazmas, HBoV kopiju skaits bija zem detekcijas līmeņa ( $>10$  kopijas/ $\mu$ g DNS). Deviņiem bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem, izmantojot PĶR metodi, noteikta HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugos, vidējā vīrusa slodze DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, bija statistiski augstāka ( $p=0,0155$ ) nekā bērniem, kuriem HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne detektēta tikai DNS paraugā, kas izdalīts no NFA (10. att.).

Pacientiem ar akūtu gastroenterītu vidējā HBoV slodze DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm, bija 389,36 kopijas/ $\mu$ g (no 93,44 līdz 1016,44 kopijas/ $\mu$ g DNS).



A –Bērni ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem ir konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugā.  
 B –Bērni ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem nav konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugā.

10. attēls. Vidējā HBoV slodze NFA paraugos bērniem kuriem konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugā un bērniem, kuriem nav konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugā.

Figure 10. Average HBoV load in NFA samples from children with presence of HBoV1 mRNA in PBMCs and average HBoV load in NFA samples from children without presence of HBoV1 mRNA in PBMCs.

### 3.5. Koinfekciju noteikšana

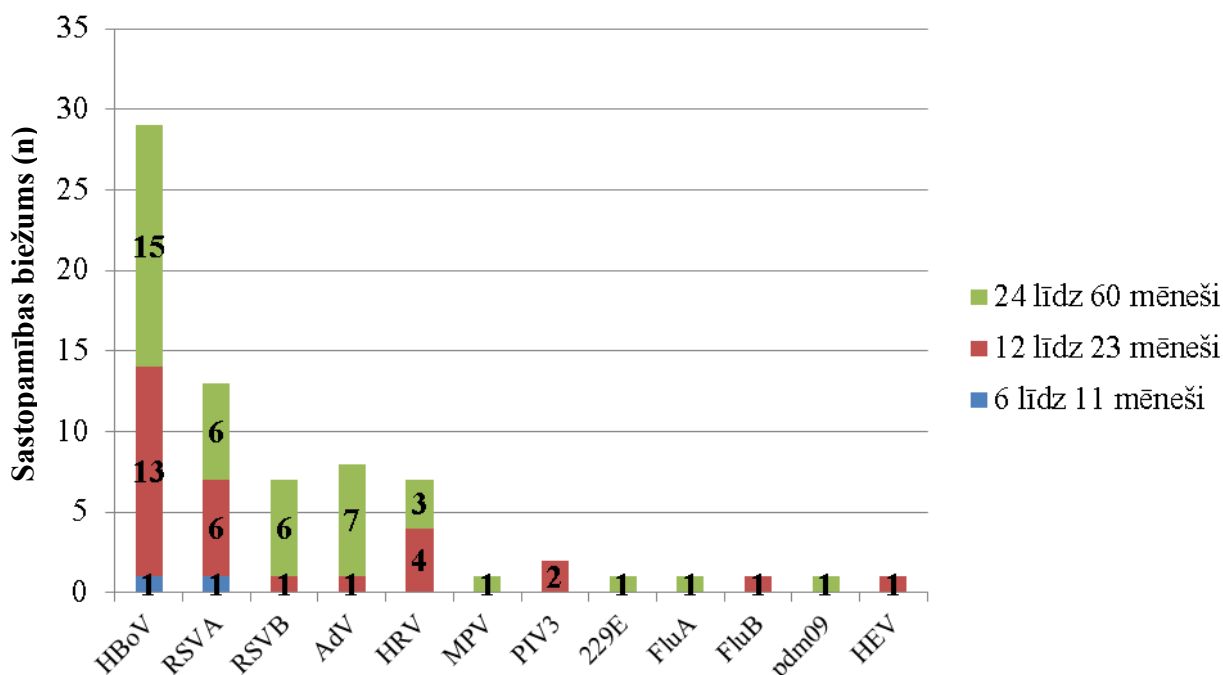
#### 3.5.1. Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām

Izmantojot multipleksētu reālā laika PĶR (*Multiplex Real-time PCR*) metodi, 44 DNS paraugos, kas izdalīti no NFA pārbaudīja 19 respiratoro vīrusu klātbūtni.

Deviņos no 44 (20,45%) gadījumiem, DNS paraugā konstatēts tikai viens no pārbaudītajiem vīrusiem, 20 no 44 (45,45%) bērniem konstatēta divu vīrusu klātbūtne, pieciem no 44 (11,36%) pacientiem konstatēti trīs vīrusu klātbūtne, astoņiem no 44 (18,18%) pacientiem četru vīrusu klātbūtne DNS paraugā, kas izdalīts no NFA. Diviem no 44 (4,55%) pacientiem DNS paraugā netika atrasts neviens no pārbaudītajiem vīrusiem.

Visbiežāk konstatētais respiratorais vīruss bija HBoV, ko detektēja 29 no 44 (65,91%) pārbaudītajiem DNS paraugiem. Visiem 29 bērniem, HBoV1 genoma sekvences klātbūtne DNS paraugos, kas izdalīta no NFA bija konstatēta arī ar PĶR metodi. Otrs biežāk detektētais vīruss bija A tipa respiratori sincitiālais vīruss (RSVA), ko konstatēja 23 no 44 (52,27%) DNS

paraugiem. Trešais biežāk konstatētais respiratorais vīruss bija adenovīruss (AdV), ko atrada 14 no 44 (31,82%) DNS paraugiem. Deviņos no 44 (20,45%) paraugiem detektēja rinovīrusu (HRV), septiņos (15,91%) paraugos detektēja B tipa respiratori sincitiālo vīrusu (RSVB) un trīs (6,82%) paraugos detektēja metapneimovīrusu (MPV). Trešā tipa paragripas vīrusu (PIV3) un koronavīrusu 229E (229E) atrada divos paraugos, kas sastāda 4,55%. Enterovīrusu (HEV), koronavīrusu NL63 (NL63), koronavīrusu OC43 (OC43), A tipa gripas vīrusu (FluA), B tipa gripas vīrusu (FluB) un A tipa gripas vīrusa apakštipu H1pdm09 (pdm09), katru konstatēja tikai vienā paraugā. 33 DNS paraugos detektēti vairāki respiratorie vīrusi vienlaicīgi. Astoņos paraugos vienlaicīgi detektēja četru respiratoro vīrusu klātbūtni, piecos paraugos trīs vīrusu klātbūtni un 20 paraugos detektēja divu vīrusu klātbūtni. Pirmā, otrā un ceturtnā tipa paragripas vīrusus (PIV1, PIV2, PIV4), A tipa gripas vīrusa apakštipus H1 (FluA-H1) un H3 (FluA-H3) neatrada nevienā no pārbaudītajiem paraugiem. Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām apkopota pielikumā Nr. 1. Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem, kuriem konstatēta HBoV1 genoma sekvence DNS paraugos, parādīta 11. attēlā. Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem, kuriem nav konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne organismā, parādīta 12. attēlā.

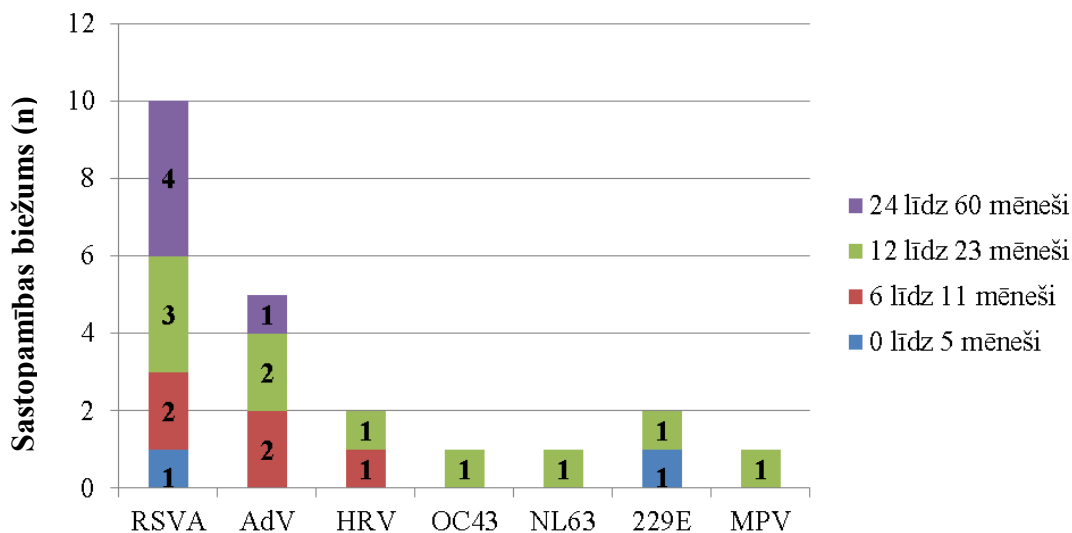


\*Vecuma grupā no nulles līdz 5 mēnešiem, nevienam no pacientiem netika konstatēta HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne pārbaudītajos DNS paraugos.

\*\*Vairākiem pacientiem vienlaicīgi konstatēta vairāku (līdz 4) vīrusu klātbūtne.

11. attēls. Respiratoro vīrusu sastopamība pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem konstatēta HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne.

Figure 11. The presence of respiratory viruses in patients with lower respiratory tract diseases whom HBoV1 genome sequence is detected.



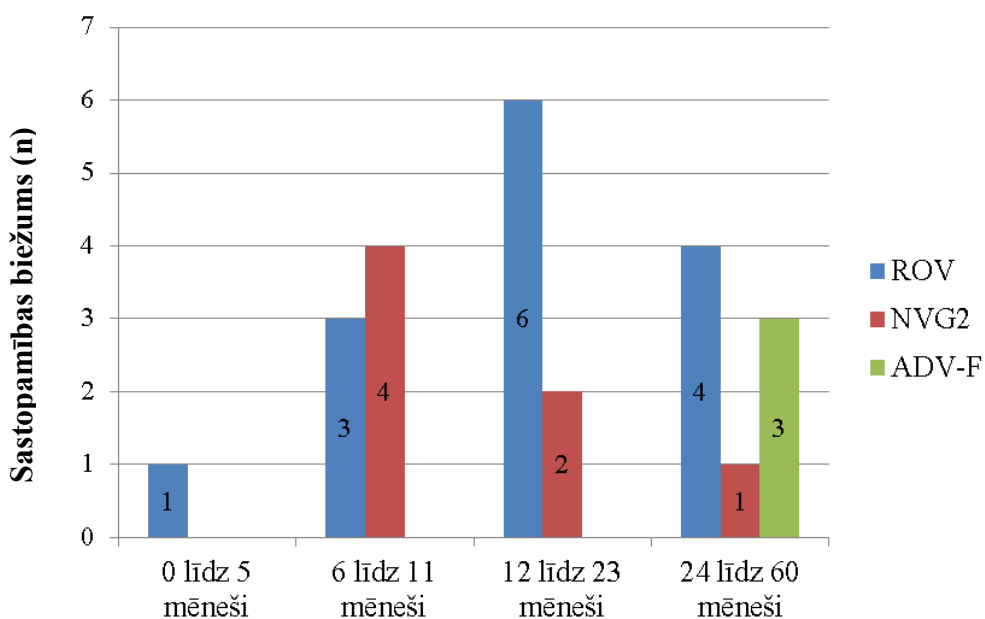
\*Vairākiem pacientiem vienlaicīgi konstatēta vairāku (līdz 4) vīrusu klātbūtne.

12. attēls. Respiratoro vīrusu sastopamība pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem nav detektēta HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne.

Figure 12. Presence of respiratory viruses in patients with lower respiratory tract diseases, whom HBoV1 genome sequence is not detected.

### 3.5.2. Kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu

Izmantojot reālā laika PQR (*Multiplex Real-time PCR*) metodi, 36 DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm noteica sešu kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtni. Visbiežāk detektētais vīruss bija rotavīruss (ROV), ko detektēja 14 no 36 (38,89%) pacientiem. Otrs biežāk detektētais vīruss bija norovīruss GII (NVG2), kura klātbūtne konstatēta septiņos no 36 (19,44%) DNS paraugiem. Trešais biežāk konstatētais vīruss bija adenovīruss F (AdV-F), ko konstatēja trīs (8,33%) pacientiem ar akūtu gastroenterītu. Norovīrusa GI (NVG1), astrovīrusa (ASV) un sapovīrusa (SV) klātbūtni nekonstatēja nevienā no pārbaudītajiem DNS paraugiem. Pieciem pacientiem organismā konstatēja divu vīrusu klātbūtni vienlaicīgi. Savukārt, 17 no 36 (47,22%) pacientiem organismā nekonstatēja nevienu no pārbaudītajiem vīrusiem. Kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu parādīta 13. attēlā un apkopota pielikumā Nr. 2.



\* Vairākiem pacientiem vienlaicīgi konstatēta vairāku (līdz 2) vīrusu klātbūtne.

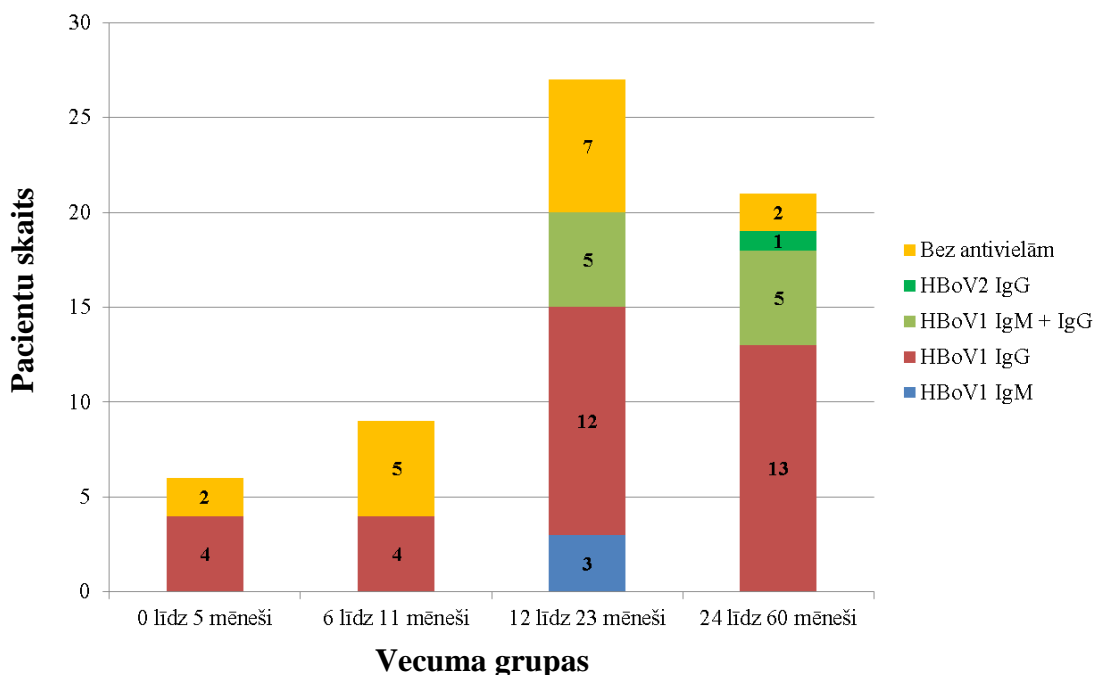
13. attēls. Kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu.

Figure 13. Presence of gastrointestinal viruses in patients with acute gastroenteritis.

### 2.13. HBoV specifisko antivielu klātbūtne plazmas paraugos

63 pacientiem ar akūtām dziļāko elpceļu slimībām noteica HBoV1-4 tipu specifisko IgG un IgM klases antivielu klātbūtni plazmas paraugā. HBoV1 specifiskās IgM klases antivielas

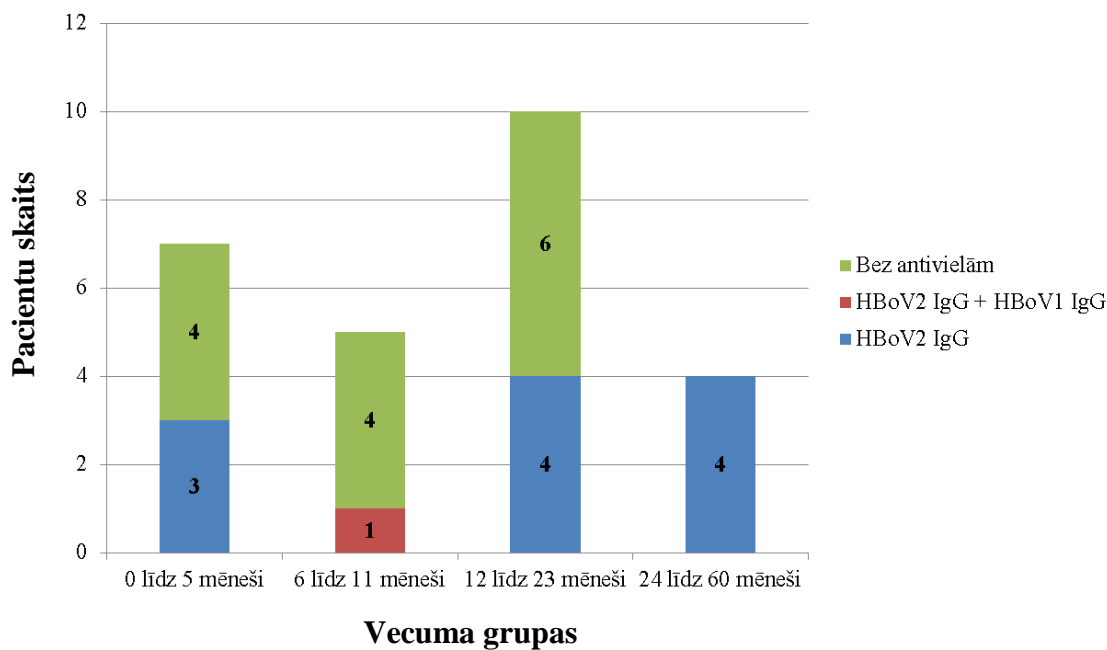
plazmā konstatēja 13 no 63 (20,63%) bērniem. HBoV1 specifiskās IgG klases antivielas konstatēja 43 no 63 (68,25%) bērniem. HBoV1 specifisko IgM un IgG klases antivielu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām parādīta 14. attēlā. Vienam bērnam ar dziļāko elpceļu slimībām tika konstatēta HBoV2 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne plazmas paraugā. BoV3-4 specifiskās IgM un IgG klases antivielas plazmas paraugā nedetektēja nevienam bērnam ar dziļāko elpceļu slimībām.



14. attēls HBoV1 specifisko IgM un IgG klases antivielu, un HBoV2 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām.

Figure 14. Presence of HBoV 1 specific IgM and IgG class antibodies and HBoV2 specific IgG class antibodies in patients with lower respiratory tract diseases.

30 pacientiem ar akūtu gastroenterītu noteica HBoV1-4 tipu specifisko IgM un IgG klases antivielu klātbūtni plazmas paraugos. HBoV1 specifiskās IgG klases antivielas detektēja 12 no 30 (40%) plazmas paraugos. HBoV2 specifiskās IgG klases antivielas detektēja piecos no 30 (16,67%) plazmas paraugiem. Vienam bērnam vienlaicīgi tika konstatēta HBoV1 un HBoV2 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne organismā. HBoV1-2 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu parādīta 15. attēlā. HBoV1-4 specifiskās IgM klases antivielas, kā arī HBoV3-4 specifiskās IgG klases antivielas nekonstatēja nevienam no pacientiem ar akūtu gastroenterītu.



15. attēls. HBoV1 un HBoV2 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu.

Figure 15. Presence of HBoV1 and HBoV2 specific IgG class antibodies in patients with acute gastroenteritis.

#### 2.14. Citokīnu līmenis plazmā

Citokīnu TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 un IL-13 līmeni plazmas paraugā analizēja 60 pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām.

Četriem no 60 (6,67%) pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām citokīna TNF- $\alpha$  līmeni asins plazmas paraugā bija detekcijas robežās. Vidējais TNF- $\alpha$  līmenis plazmas paraugos bija 16,05 pg/ml. Paaugstināts citokīna IFN- $\gamma$  līmenis asins plazmas paraugā bija 27 no 60 (45%) pacientiem, vidējais IFN- $\gamma$  līmenis 147,75 pg/ml. Astoņiem (13,33%) pacientiem bija paaugstināts citokīna IL-2 līmenis plazmas paraugā, vidējais IL-2 līmenis 45,00 pg/ml. Citokīna IL-4 līmenis bija paaugstināts 12 no 60 (20%) asins plazmas paraugos. Vidējais IL-4 līmenis plazmas paraugos bija 28,28 pg/ml. 18 no 60 (30%) asins plazmas paraugiem konstatēja paaugstinātu citokīna IL-10 līmeni. Vidējais IL-10 līmenis asins plazmas paraugos bija 74,12 pg/ml. Nevienā no pārbaudītajiem asins plazmas paraugiem, nekonstatēja paaugstinātu citokīna IL-13 līmeni.

### **3.8. Klīniskais raksturojums pacientiem, kuriem konstatēta tikai HBoV infekcija**

#### **3.8.1. Pacienti ar dziļāko elpceļu slimībām**

Diviem pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām HBoV1 bija vienīgais detektētais patogēns pārbaudītajos DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, perifērajām asinīm un kDNS, kas iegūts no PBMC. Vienam no šiem pacientam HBoV1 genoma sekvences klātbūtni konstatēja arī DNS, kas izdalīta no šūnām brīvas ains plazmas.

Pirmais pacients bija 17 mēnešus vecs zēns, kurš hospitalizēts slimības septītajā dienā, 2015. gada janvārī. Bērnā septiņas dienas jau bija bijis klepus un pēdējās divas dienas arī drudzis ( $T > 39^{\circ}\text{C}$ ). Bērnā tika uzstādīta pamata klīniskā diagnoze - akūts bronhīts ar komplikāciju (neprecizēta bronhopneimonija), un zēns tika nogādāts intensīvās terapijas nodaļā. Elpošanas ātrums bija 44 ieelpas/min, sirdsdarbība bija 146 sitieni/min. Elpošanai izmantoja palīgmuskulatūru un konstatēja plaušu abu pušu krepitāciju un auskultatīvu atradni. Plaušu rentgenuzņēmums parādīja labās puses infiltrāciju. Asins analīzes uzrādīja leikocītu skaitu  $30,6 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO līmenis serumā bija 5.09 mg/l. Bērna medicīniskais stāvoklis tika raksturots kā smags un ārstēšanās ilgums stacionārā bija 47 dienas.

Otrs pacients bija 18 mēnešus vecs zēns, kurš bija hospitalizēts otrajā slimības dienā, 2015. gada decembrī. Arī šim pacientam uzstādīja pamata klīnisko diagnozi - akūts bronhīts ar komplikāciju neprecizēta bronhopneimonija. Šī bērna medicīniskais stāvoklis nebija tik smags kā pirmajam pacientam. Asins analīžu rezultāti uzrādīja leikocītu skaitu  $10,29 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO bija 1,82 mg/l. Ārstēšanās ilgums stacionārā bija trīs dienas.

#### **3.8.2. Pacienti ar akūtu gastroenterītu**

Četriem pacientiem ar akūtu gastroenterītu, HBoV2 bija vienīgais konstatētais vīruss organismā. Pirmā paciente bija 24 mēnešus veca meitene, kura hospitalizēta slimības otrajā dienā. Bērnā uzstādīja pamata klīnisko diagnozi - caureja un gastroenterīts. Asins analīžu rezultāti uzrādīja leikocītu skaitu  $23,82 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO līmeni 152,34 mg/l. Otrs pacients bija septiņus mēnešus vecs zēns, kurš hospitalizēts piektajā slimības dienā. Zēnam uzstādīja pamata klīnisko diagnozi neprecizēti funkcionāli zarnu darbības traucējumi ar vemšanu. Leikocītu skaits asinīs bija  $21,67 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO līmenis bija 3,53 mg/l. Trešā paciente bija 21 mēnesi veca meitene, kura hospitalizēta pirmajā slimības

dienā ar neprecizētiem funkcionāliem zarnu darbības traucējumiem. Leikocītu skaits bija  $7,42 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO līmenis bija 11,5 mg/l. Ceturtais bērns bija 16 mēnešus vecs zēns, kurš hospitalizēts slimības otrajā dienā ar pamata klīnisko diagnozi – neprecizēti funkcionāli zarnu darbības traucējumi ar vemšanu. Leikocītu skaits asinīs bija  $7,26 \times 10^3/\mu\text{l}$  un CRO līmenis – 1,45 mg/l. Visiem četriem bērniem, stacionēšanās brīdī, bija drudzis ( $T > 38^\circ\text{C}$ ). Pirmā, otrā, trešā un ceturkā bērna ārstēšanās ilgums stacionārā attiecīgi bija septiņas, divas, četras un trīs dienas.

#### 4. DISKUSIJA

Šajā pētījumā, izmantojot PĶR metodi, noteikta HBoV1 genoma sekvenču klātbūtne 63 bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām. HBoV1 NS1 gēna sekvenču klātbūtne noteikta DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, un HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC. Kā arī noteikta HBoV1-4 VP1/VP2 gēna sekvenču klātbūtne DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm, perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, 36 bērniem ar akūtu gastroenterītu.

HBoV1 genoma sekvenču klātbūtni organismā konstatē 29 no 63 (46,03%) DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, kas ir salīdzinoši augsts rādītājs. Citviet pasaulē, HBoV1 sastopamība elpceļu slimību gadījumos vidēji ir no diviem līdz 33% bērniem, kas jaunāki par diviem gadiem (Tabasi et al. 2016; Zaghoul 2011; Haidopoulou et al. 2010).

Šajā pētījumā iegūtais, salīdzinoši augstais pozitīvo gadījumu skaits, visticamāk skaidrojams ar faktu, ka lielākā daļa (53/63) no pētījumā iekļautajiem pacientiem tika mērķtiecīgi atlasīti (pacientiem slimnīcā nebija konstatēts neviens no pārbaudītajiem respiratorajiem patogēniem). Tikai deviņiem pētījumā iekļautajiem pacientiem, izmantojot imūnfluorescences metodi, bija konstatēta RSV, un vienam pacientam A tipa gripas vīrusa klātbūtne NFI paraugā.

Literatūrā ir minēts, ka parauga izvēlei ir liela nozīme vīrusa detektēšanā elpceļos. Pētījumos par RSV un gripas vīrusu ir pierādīts, ka NFA paraugos vīrusa DNS ir detektējams daudz lielākā daudzumā, salīdzinājumā ar uztriepju paraugiem. Zinātnieks H. K. Chan ar kolēģiem savā pētījumā salīdzinājuši RSV un gripas vīrusa slodzi DNS paraugos, kas iegūti no NFA un atbilstošiem NFI paraugiem no bērniem ar akūtu elpceļu infekciju. Analizējot 196 NFA un atbilstošos NFI paraugus, noteikts, ka vidējā RSV slodze NFA paraugos ir deviņas reizes augstāka salīdzinājumā ar uztriepju paraugiem, un 33 reizes augstāka gripas vīrusa gadījumā (Chan et al. 2008). Arī citā pētījumā iegūst līdzīgus rezultātus, kad 97% no pārbaudītajiem NFA paraugiem konstatē RSV klātbūtni, bet atbilstošajos uztriepju paraugos - 76% (Heikkinen et al. 2002). Šādi salīdzinoši pētījumi HBoV1 gadījumā nav veikti, tomēr parauga izvēlei vīrusa detektēšanā varētu būt liela nozīme, īpaši gadījumos, kad vīrusa slodze organismā ir zema. To parāda arī šī pētījuma rezultāti. 20 no 30 (66,67%) pārbaudītajiem pacientiem, slimnīcā nekonstatēja RSV, AdV, PIV, FluA vai FluB klātbūtni NFI paraugā. Tomēr, pārbaudot šos 20 pacientus, izmantojot multiplex reālā laika PĶR metodi, deviņiem konstatē RSV, pieciem AdV un vienam PIV3 klātbūtni DNS, kas izdalīta no NFA. Atšķirīgais

rezultāts skaidrojams ar to, ka slimnīcā izmantoti NFI, nevis NFA paraugi, kā arī vīrusu klātbūtne noteikta, izmantojot citu metodi.

Kopumā deviņiem no 63 (14,29%) pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne DNS, kas izdalīta no perifērajām asinīm un vienam no šiem pacientiem papildus arī DNS, kas izdalīta no šūnām brīvas asins plazmas. Vīrusa klātbūtne asinīs norāda, ka vīruss cirkulē organismā. Pieciem no deviņiem pacientiem, kuriem vīruss konstatēts DNS, kas izdalīta no asinīm, atrasta arī HBoV1 mRNS klātbūtne PBMC paraugos, kas nozīmē, ka vīrusa genoms organismā replicējas. Zinātnieks A. Christensen ar kolēģiem, HBoV1 mRNS konstatē 31% no 86 bērniem, kuriem diagnosticēta dziļāko elpceļu slimība, bet kontroles grupā HBoV1 mRNS klātbūtni nekonstatē. Turklāt, 19% no 86 bērniem ar dziļāko elpceļu slimībām, HBoV1 ir vienīgais detektētais patogēns (Christensen et al. 2013). Uzskata, ka piemērotākās metodes HBoV1 primāras infekcijas identificēšanai ir HBoV1 mRNS noteikšana, HBoV1 DNS noteikšana seruma paraugos, kā arī HBoV1 specifisko antivielu noteikšana (Kantola et al. 2015).

HBoV2 genoma sekvenses klātbūtni DNS paraugā, kas izdalīts no fēcēm, konstatē pieciem no 36 (13,89%) pacientiem ar akūtu gastroenterītu. Vienam no 36 pacientam konstatē HBoV3 klātbūtni DNS paraugā, kas izdalīts no fēcēm. Iegūtais rezultāts ir līdzīgs ar citu pētījumu rezultātiem. S. Romani ar kolēģiem konstatē HBoV2 un HBoV3 klātbūtni pacientiem ar akūtu gastroenterītu. HBoV2 konstatē 13 no 294 (4,42%), bet HBoV3 vienā no 294 analizētajiem DNS paraugiem, kas izdalīti no fēcēm. Pētījumā konstatē arī HBoV1 DNS klātbūtni fēcju paraugos trim no 294 (1,02%) pacientiem (Romani et al. 2013). Pētījumā, kas veikts Ķīnā, 366 fēcju paraugos, kas ņemti no bērniem ar akūtu gastroenterītu noteikta HBoV1-4 genoma sekvenses klātbūtne ar nPKR metodi. HBoV2 konstatē 33 no 366 (9,02%) un HBoV3 konstatē divos no 366 (0,55%) DNS paraugiem, bet HBoV4 genoma sekvenses klātbūtni neatrod nevienā no DNS paraugiem (Wang et al. 2011). Abos pieminētajos pētījumos, pacientiem ar gastroenterītu konstatē arī HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni fēcju paraugos, attiecīgi trim no 294 (1,02%) pacientiem un deviņiem no 366 (2,46%) pacientiem, kas atšķiras no šajā pētījumā iegūtā rezultāta, tomēr šajā pētījumā nevienam no bērniem ar akūtu gastroenterītu nekonstatē HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni analizētajos DNS paraugos.

Šajā pētījumā konstatēts, ka deviņiem (14,3%) pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, kuriem atrasta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne arī DNS paraugā, kas izdalīts no asinīm, ir statistiski augstāka vidējā HBoV1 slodze DNS paraugos, kas izdalīti no NFA, salīdzinājumā ar tiem pacientiem, kuriem HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne atrasta tikai DNS, kas izdalīta no NFA ( $p=0.0155$ ). Jāpiemin, ka pieciem no deviņiem pacientiem konstatē arī

HBoV1 mRNS klātbūtni PBMC paraugos. Iegūtais rezultāts sakrīt ar citos pētījumos iegūtiem rezultātiem. Zinātnieks A. Christensen ar kolēģiem savā pētījumā nosaka HBoV1 mRNS klātbūtni NFA paraugos, kas ņemti no bērniem ar elpceļu slimībām, kā arī no asimptomātiskiem bērniem. HBoV1 mRNS atrasts 33 no 133 (25%) NFA paraugiem, kas ņemti no pacientiem ar elpceļu slimībām, bet NFA paraugos, kas ņemti no asimptomātiskiem pacientiem, HBoV1 mRNS nedetektē. Pētījuma autori arī savstarpēji salīdzina vidējo HBoV1 slodzi NFA paraugos no pacientiem, kuriem konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne elpceļos, ar vidējo HBoV1 slodzi NFA paraugos no pacientiem, kuriem nav konstatēta HBoV1 mRNS. Rezultāti parāda statistiski būtisku atšķirību – pacientiem, kuriem konstatēta HBoV1 mRNS klātbūtne, attiecīgi ir lielāka vidējā HBoV1 slodze NFA paraugos (Christensen et al. 2013). Citā pētījumā arī novēro, ka vidējā HBoV1 slodze NFA paraugos ir nozīmīgi augstāka pacientiem, kuriem konstatēta ne tikai HBoV1 DNS klātbūtne, bet arī HBoV1 mRNS klātbūtne organismā (Proença-Modena et al. 2011).

Šajā pētījumā iekļautajiem pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, 42 no 44 (95,45%) gadījumiem konstatē vismaz viena respiratorā vīrusa klātbūtni DNS, kas izdalīta no NFA. Visbiežāk detektētais vīruss ir HBoV1 (65,91%), kam seko RSVA (52,27%), AdV (31,82%), HRV (20,45%), RSVB (15,91%), MPV (6,82%), PIV3 (4,55%), CoV229E (4,55%). Savukārt HEV, CoVNL63, CoVOC43 OC43, FluA, FluB un FluA-H1pdm09 klātbūtni konstatē tikai vienā paraugā. HBoV1 koinfekciju ar citiem respiratorajiem vīrusiem konstatē 93,10% gadījumu. Arī citos pētījumos iegūst līdzīgu rezultātu. 2016. gadā publicēts pētījums, kurā noteikta respiratoro vīrusu klātbūtne 347 nazofaringeālo uztriepju paraugos, kas ņemti no pacientiem ar smagām elpceļu slimībām. Pētījumā analizēta 17 respiratoro vīrusu klātbūtne DNS paraugos, kas izdalīti no NFA uztriepēm, tai skaitā, arī HBoV1, RSV, AdV, MPV, CoV229E, CoVNL43, CoVHKU1, PIV1-4, FluA, FluB, HEV un HRV. Pētījumā visbiežāk detektētais vīruss bija AdV (27,4%, 95/347), kam sekoja RSV (13,3%, 46/347), HEV un HRV (11,5%, 40/347), HBoV1 (10,7%, 37/347), gripas vīruss (9,8%, 34/347; gripas vīrusa tips A/H3N2 [6,3%, 22/347], gripas vīruss B [2,3%, 8/347], gripas vīrusa tips A/H1N1/2009 [1,2%, 4/347]), PIV (6,6%, 23/347), CoV (5,8%, 20/347) un MPV (4%, 14/347) (Kenmoe et al. 2016). Citā pētījumā noteikta HBoV1 koinfekcija ar AdV, RSV, MPV, HRV, PIV, CoV un gripas vīrusu bērniem ar elpceļu slimībām. Koinfekciju ar vismaz vienu respiratoro vīrusu konstatēja 72,9% gadījumu. Biežāk konstatētais respiratorais vīruss bija RSV (45,8%), kam sekoja HRV (33,3%), MPV (18,8%) un AdV (14,5%) (Proença-Modena et al. 2011). Ilgstoša HBoV1 saglabāšanās elpceļos, varētu būt viens no skaidrojumiem biežajiem koinfekciju gadījumiem (Jartti et al. 2012).

Pacientiem ar akūtu gastroenterītu noteikta sešu biežāk sastopamo kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne DNS, kas izdalīta no fēcēm. Pārbaudot 36 paraugus, 19 paraugos detektēts vismaz viens no kuņģa-zarnu trakta vīrusiem. Visbiežāk konstatē ROV (38,89%), kam seko NVG2 (19,44%) un ADV-F (8,33%). 17 (47,22%) no pārbaudītajiem paraugiem, nedetektē nevienu no vīrusiem. Diviem no sešiem pacientiem, kuriem noteikta HBoV2 klātbūtne organismā, konstatē koinfekciju ar kuņģa-zarnu trakta vīrusu/iem (vienā gadījumā ar ROV; otrā ar ROV un ADV-F). Citos pētījumos pasaulē arī ir noteikta HBoV2 koinfekcija ar citiem kuņģa-zarnu trakta vīrusiem...

Līdz ar HBoV serodiagnostikas metodes izstrādāšanu, ir iespējams identificēt akūtu HBoV infekciju (Kantola et al. 2008). HBoV seroloģijas pētījumu rezultāti parāda, ka HBoV specifisko IgM klases antivielu klātbūtne organismā norāda uz akūtu primāru HBoV infekciju, savukārt HBoV IgG klases antivielu klātbūtne norāda uz senu vai sekundāru infekciju (Söderlund-Venermo et al. 2009; Hedman et al. 2010; Kantola et al. 2015). Šajā pētījumā HBoV1 specifiskās IgM klases antivielas plazmas paraugā konstatē 13 no 63 (69,84%) bērniem ar elpceļu slimībām, kas norāda, ka šiem bērniem ir primāra HBoV1 infekcija. Visiem 13 bērniem, izmantojot PQR metodi detektēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne DNS, kas izdalīta no NFA, kā arī deviņiem no 13 bērniem, konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne DNS, kas izdalīta no perifērajām asinīm. HBoV1 specifiskās IgG klases antivielas konstatēja 44 no 63 (69,84%) bērniem. 18 no 44 bērniem konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne DNS, kas izdalīta no NFA. Vienam no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām konstatē HBoV2 specifiskās IgG klases antivielas, bet, izmantojot PQR metodi, bērnam nekonstatē HBoV2 genoma sekvenses klātbūtni DNS paraugā, kas izdalīts no NFA. Pieciem bērniem ar akūtu gastroenterītu konstatē HBoV2 specifiskās IgG klases antivielas. Visiem pieciem bērniem, izmantojot PQR metodi, detektē HBoV2 genoma sekvenses klātbūtni DNS, kas izdalīta no fēcēm. 12 pacientiem ar akūtu gastroenterītu, plazmas paraugā konstatē HBoV1 IgG klases antivielas, kas visdrīzāk norāda uz senu HBoV1 infekciju, jo nevienam pacientam DNS paraugā, kas izdalīts no fēcēm nedetektēja HBoV1 genoma sekvenses klātbūtni. Iespējams, ka bērns HBoV1 IgG klases antivielas ir ieguvis no mātes grūtniecības laikā un tās vēl ir saglabājušās organismā, jo trīs no 12 bērniem ir vecumā no viena līdz 5 mēnešiem. Literatūrā teikts, ka HBoV seropozitivāte, kas iegūta no mātes, vidēji saglabāties līdz sešu mēnešu vecumam (Endo et al. 2007; Kahn et al. 2008). Pasaulē veiktie HBoV seroloģijas pētījumu rezultāti parāda, ka visbiežāk cilvēkus inficē HBoV1, kam seko HBoV2, HBoV3 un HBoV4 (Kantola et al. 2011). Bieži akūtu no senas infekcijas izšķirt traucē HBoV DNS ilgstošā saglabāšanās saimniekorganismā, kas atsevišķiem pacientiem ir

novērota pat vairākus mēnešus pēc sākotnējās inficēšanās (Blessing et al. 2009; Martin et al 2010; Martin et al. 2015).

Ņemot vērā, citos pētījumos analizēto citokīnu līmeni pacientiem ar HBoV1 infekciju, šajā pētījumā, analizēts citokīnu TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 un IL-13 līmenis plazmas paraugos no pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām. Pētījumos, kas veikti izmantojot in vitro modeļus, novēro, ka HBoV1 VP2 vīrusveidīgās daļiņas ierosina citokīnu IL-13, IFN- $\gamma$  un IL-10 atbildi CD4+ T šūnās (Kumar et al. 2011; Lindner et al. 2008). Iegūtais rezultāts parāda, ka 27 no 60 pacientiem plazmas paraugā konstatē paaugstinātu IFN- $\gamma$  līmeni, no kuriem 13 pacientiem organismā konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne. 17 pacientiem bija salīdzinoši augstāks IL-10 līmenis plazmas paraugā, no kuriem septiņiem DNS paraugā, kas izdalīts no NFA konstatēta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne. Šajā pētījumā nevienā no pārbaudītajiem plazmas paraugiem nekonstatē paaugstinātu IL-13 līmeni. Vēl kādā pētījumā, HBoV1 pozitīvos NFA paraugos, kas ņemti no pacientiem ar bronhiolītu novēro paaugstinātu Th1 un Th2 šūnu citokīnu IFN- $\gamma$ , IL-2 un IL-4 līmeni, salīdzinājumā ar kontroles grupu (Chung et al. 2008). Šajā pētījumā astoņiem pacientiem konstatē paaugstinātu IL-2 līmeni, no kuriem tikai diviem ir atrasta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne organismā. Paaugstinātu IL-4 līmeni konstatē 12 pacientiem, pieciem no tiem atrasta HBoV1 genoma sekvenses klātbūtne organismā. Tikai trijos no 60 (5%) analizētajiem plazmas paraugiem ir salīdzinoši augstāks citokīna TNF- $\alpha$  līmenis, turklāt nevienam no šiem pacientiem nekonstatē HBoV1 klātbūtni pārbaudītajos DNS paraugos. J. Y. Chung savā pētījumā konstatē arī to, ka vidējais TNF- $\alpha$  līmenis ir ievērojami augstāks pacientiem ar RSV infekciju, salīdzinājumā ar pacientiem, kuriem ir HBoV1 infekcija, kas arī nesakrīt ar šajā pētījumā iedūto rezultātu, jo nevienam no pacientiem ar RSVA vai RSVB klātbūtni organismā, nekonstatē paaugstinātu TNF- $\alpha$  līmeni. Lai varētu pārliecinoši spriest par HBoV1 ietekmi uz imūnsistēmu un citokīnu līmeņu izmaiņām HBoV1 infekcijas gadījumā, nepieciešams pētījumu paplašināt un iekļaut kontroles grupu, ko ir plānots darīt turpmākajos pētījumos.

Šajā pētījumā četriem no 36 (11,11%) pacientiem ar akūtu gastroenterītu HBoV2 ir vienīgais konstatētais patogēns pārbaudītajos DNS paraugos, izmantojot nPKR metodi. Arī fēču bakteriālie uzsējumi, kas veikti slimnīcā, neuzrāda Shigella un Salmonella ģinšu baktēriju klātbūtni fēcēs. Diviem bērniem asinīs konstatē paaugstinātu leukocītu skaitu ( $23,82 \times 10^3/\mu\text{l}$  [norma:  $4,86 - 13,18 \times 10^3/\mu\text{l}$ ] un  $21,67 \times 10^3/\mu\text{l}$  [norma:  $5,98 - 13,51 \times 10^3/\mu\text{l}$ ]) un vienam bērnam paaugstinātu CRO līmeni ( $152,34 \text{ mg/l}$ ) asinīs, kas tomēr norāda uz bakteriālu infekciju. HBoV2 slodze šiem bērniem DNS paraugos, kas izdalīta no fēcēm attiecīgi ir: 93,44 kopijas/ $\mu\text{g}$  DNS, 393,62 kopijas  $\mu\text{g/DNS}$ , 900,59 kopijas/ $\mu\text{g}$  DNS un 98,45 kopijas/ $\mu\text{g}$  DNS. Visiem četriem pacientiem plazmas paraugā detektē HBoV2 specifiskās IgG

klases antivielas, kā arī vienam no četriem pacientiem papildus konstatē arī HBoV1 specifiskās IgG klases antivielas plazmā. Lai gan citos pētījumos HBoV2 atradni DNS paraugos, kas izdalīti no fēcēm, asociē ar gastroenterīta izraisīšanu (Arthur et al. 2009; Chow et al. 2010; Han et al. 2009; Santos et al. 2010), tomēr fakts, ka HBoV2 genoma sekvenca nav atrasta DNS paraugos, kas izdalīti no perifērajām asinīm un no šūnām brīvas asins plazmas, kā arī plazmas paraugos nekonstatē HBoV2 specifiskās IgM klases antivielas, liek apšaubīt HBoV2 iesaisti gastroenterīta izraisīšanā šiem pacientiem. Biežāk sastopamie virālie gastroenterīta izraisītāji ir rotavīruss A, Caliciviridae dzimtas vīrusi (piemēram, norovīrusi un sapovīruss), adenovīrusi un astrovīruss. Pētījumu rezultāti norāda, ka arī vairāki Picornaviridae dzimtas vīrusi un Aichi vīruss ir asociējami ar akūta gastroenterīta izraisīšanu (Liu et al. 2012). Šajā pētījumā pacientiem noteikta sešu izplatītāko gastroenterīta izraisīto kuņģa-zarnu trakta vīrusu un baktēriju *Salmonella* spp. un *Shigella* spp. klātbūtne fēcēs. Tomēr jāņem vērā, kaut arī bieži caurejas izraisītājs ir virāla, bakteriāla vai parazitiska infekcija, tomēr pēdējos gados aizvien biežāk konstatē neinfekciozas caurejas gadījumus. Neinfekciozu caureju var izraisīt pārtikas nepanesamība, saindēšanās ar medikamentiem un citām ķīmiskām vielām, kā arī kairināto zarnu sindroms, celiakija un citas slimības (Humphries and Linscott 2015), kas jāņem vērā arī šajā pētījumā.

Šajā pētījumā diviem no 63 (3,17%) pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām, HBoV1 ir vienīgais detektētais respiratorais patogēns pārbaudītajos paraugos. Turklāt, abiem pacientiem HBoV1 NS1 gēna sekvenca klātbūtni konstatē ne tikai DNS paraugā, kas izdalīts no NFA, bet arī DNS, kas izdalīta no perifērajām asinīm un kDNS, kas iegūta no PBMC. Kā arī vienam no pacientiem HBoV1 genoma sekvenca klātbūtni detektē DNS paraugā, kas izdalīts no šūnām brīvas asins plazmas. Abiem bērniem konstatē arī HBoV1 specifiskās IgG un IgM klases antivielas plazmas paraugā. Novēro arī augstu vīrusa slodzi DNS paraugos, kas izdalīti no NFA (568466,54 un 13494356,73 kopijas/ $\mu$ g DNS). Pirmajam pacientam leikocītu skaits asnīs ir paaugstināts -  $38,38 \times 10^3/\mu$ l (norma:  $5,98 - 13,51 \times 10^3/\mu$ l), kas liecina par bakteriālu infekciju, bet CRO līmenis ir zems – 5,11 mg/l, kas savukārt norāda uz virālu infekciju. Otrajam pacientam leikocītu skaits asinīs ir  $10,29 \times 10^3/\mu$ l (norma:  $5,98 - 13,51 \times 10^3/\mu$ l) un CRO līmenis 1,82mg/l, kas norāda uz virālu infekciju. Abiem pacientiem uzstādīta pamata klīniskā diagnoze – neprecizēta bronhopneimonija. Otrā pacienta veselības stāvoklis nebija raksturots kā smags, un bērns slimnīcā pavadīja trīs dienas. Savukārt pirmā pacienta veselības stāvoklis bija raksturots kā smags. Bērns pēc uzņemšanas slimnīcā tika nogādāts intensīvās terapijas nodaļā, kur pavadīja 47 dienas. Arī literatūrā aprakstīti gadījumi, kad HBoV1 infekciju saista ar smagu elpceļu slimību izraisīšanu (Jula et al. 2013; Ender et al. 2012; Ursic et al. 2011; Krakau et al. 2015).

Elpceļu slimību gadījumā, pēc klīniskajām pazīmēm, bieži vien nav iespējams noteikt slimības etioloģisko aģentu. RSV, HRV, MPV, HBoV1 un gripas vīrusu infekcijas gadījumā, un pat bakteriālas infekcijas gadījumā, klīniskās pazīmes ir ļoti līdzīgas (Pavia 2011).

## 5. SECINĀJUMI

Šajā pētījumā iekļautajiem bērniem ar nezināmas etioloģijas dziļāko elpceļu slimībām konstatē HBoV1, bet bērniem ar nezināmas etioloģijas akūtu gastroenterītu konstatē HBoV2 un HBoV3 genoma sekvences klātbūtni organismā.

HBoV1 infekcijas gadījumā, bieži konstatē koinfekciju ar citiem respiratorajiem vīrusiem, taču atsevišķos gadījumos HBoV1 infekcija izraisa smagas elpceļu slimības bērniem.

HBoV2 un HBoV3 iesaisti gastroenterīta etiopatogēnēzē, pētījumā iekļautajiem bērniem, apšaubā fakts, ka bērniem netiek konstatēta aktīva HBoV2-3 infekcija.

## 6. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta vadošajai pētniecei Dr. med. Zaigai Norai-Krūklei par darba vadīšanu un palīdzību maģistra darba izstrādāšanā;

RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta direktorei Asoc. prof. Modrai Murovskai par iespēju izstrādāt maģistra darbu;

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

Paldies profesoram Dr. biol. Indriķim Muižniekam par darba recenzēšanu.

## 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. Berry M., Gamielien J., Fielding B. C. 2015. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. – Viruses, 7(3): 996–1019.
5. Bishop R. F., Davidson G.P., Holmes I. H., Ruck B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. – The Lancet, 2 (1973), pp. 1281–1283.
6. Böhmer A., Schildgen V., Lüsebrink J., Ziegler S., Tillmann R. L., Kleines M., Schildgen O. 2009. Novel application for isothermal nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). – Journal of Virological Methods, 158(1-2):199-201.
7. Bodewes R., Lapp S., Hahn K., Habierski A., Förster C., König M., Wohlsein P., Osterhaus A. D. 2014. Baumgärtner W. Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter. – Veterinary Microbiology, 174(1-2):1-8.
8. 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.
9. Brebion A., Vanlieferinghen P., Déchelotte P., Boutry M., Peigue-Lafeuille H., Henquell C. 2014. Fatal subacute myocarditis associated with human bocavirus 2 in a 13-month-old child. – Journal of Clinical Microbiology, 52(3):1006-8.
10. Bruning A. H. L., Susi P., Toivola H., Christensen A., Söderlund-Venermo M., Hedman K., Aatola H., Zvirbliene A., Koskinen J. O. 2016. Detection and monitoring of human bocavirus 1 infection by a new rapid antigen test. – New Microbes and New Infections, 11: 17–19.
11. Campe H., Hartberger C., Sing A. 2008. Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. – Journal of Clinical Virology, 43 (3): 340-342.

12. 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.
13. Chan K. H., Peiris J. S. M., Lim W., Nicholls J. M., Chiu S. S. 2008. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. – *Journal of Clinical Virology*, 42(1):65-9.
14. 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.
15. Chieochansin T., Kapoor A., Delwart E., Poovorawan Y., Simmonds P. 2009. Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract. – *Emerging Infectious Diseases*, 15(9):1503-5.
16. Christensen A., Døllner 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.
17. Chonmaitree T., Revai K., Grady J. J., Clos A., Patel J. A., Nair S., Fan J., Henrickson K. J. 2008. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. – *Clinical Infectious Diseases*, 46(6): 815–823.
18. Chow B. D., Ou Z., Esper F. P. 2010. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. – *Journal of Clinical Virology*, 47(2):143-7.
19. 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.
20. Cotmore S. F., Agbandje-McKenna M., Chiorini J. A., Mukha D. V., Pintel D. J., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P., Gatherer D., Davison A. J. 2014. The family Parvoviridae. – *Archives of Virology*, 159(5):1239-47.
21. 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.
22. 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.

23. Doerig C., Hirt B., Antonietti J. P., Beard P. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. – *Journal of Virology*, 64(1):387-96.
24. Don M., Söderlund-Venermo M., Valent F., Lahtinen A., Hedman L., Canciani M., Hedman K., Korppi M. 2010. Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. – *Pediatric Pulmonology*, 45(2):120-6.
25. Edner N., Castillo-Rodas P., Falk L., Hedman K., Söderlund-Venermo M., Allander T. 2012. Life-Threatening Respiratory Tract Disease with Human Bocavirus-1 Infection in a 4-Year-Old Child. – *Journal of Clinical Virology*, 20;50:531–2.
26. Endo R., Ishiguro N., Kikuta H., Teramoto S., Shirkoohi R., Ma X., Ebihara T., Ishiko H., Ariga T. 2007. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. – *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10):3218-23.
27. Flewett T. H., Bryden A. S., Davies H., Morris C. A. 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. – *The Lancet*, 1 (1975), pp. 4–5.
28. Hedman L., Söderlund-Venermo M., Jartti T., Ruuskanen O., Hedman K. 2010. Dating of human bocavirus infection with protein-denaturing IgG-avidity assays-Secondary immune activations are ubiquitous in immunocompetent adults. – *Journal of Clinical Virology*, 48(1):44-8.
29. Dijkman R., Koekkoek S. M., Molenkamp R., Schildgen O., van der Hoek L. 2009. Human Bocavirus Can Be Cultured in Differentiated Human Airway Epithelial Cells. – *Journal of Virology*, 83(15): 7739–7748.
30. 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.
31. Guido M., Zizza A., Bredl S., Lindner J., De Donno A., Quattrocchi M., Grima P., Modrow S. 2012. Seroepidemiology of human bocavirus in Apulia, Italy. – *Clinical Microbiology and Infections*, 18(4):E74-6.
32. Gurda B. L., Parent K. N., Bladek 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.
33. 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.

34. Han T. H., Chung J. Y., Hwang E. S. 2009. Human bocavirus 2 in children, South Korea. – *Emerging Infectious Diseases*, 15 (10): 1698-1700.
35. 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.
36. Heikkinen T., Marttila J., Salmi A. A., Ruuskanen O. 2002. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. – *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11):4337-9.
37. Henrickson K. J., Hoover S., Kehl K. S., Hua W. 2004. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. – *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 23(1 Suppl):S11-8.
38. 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.
39. 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.
40. Jula A., Waris M., Kantola K., Peltola V., Söderlund-Venermo M., Hedman K., Ruuskanen O. 2013. Primary and Secondary Human Bocavirus 1 Infections in a Family, Finland. - *Emerging Infectious Diseases*, 19:1328–31.
41. Kahn J. S., Kesebir D., Cotmore S. F., D'Abramo A., Cosby C., Weibel C., Tattersall P. 2008. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. – *Journal of Infectious Diseases*, 198(1):41-50.
42. Kailasan S., Halder S., Gurda B., Bladec H., Chipman P. R., McKenna R., Brown K., Agbandje-McKenna M. 2015. Structure of an enteric pathogen, bovine parvovirus. – *Journal of Virology*, 89(5):2603-14.
43. Kantola K., Hedman L., Allander T., Jartti T., Lehtinen P., Ruuskanen O., Hedman K., Söderlund-Venermo M. 2008. Serodiagnosis of Human Bocavirus Infection. – *Clinical Infectious Diseases*, 46 (4): 540-546.
44. Kantola K., Hedman L., Tanner L., Simell V., Mäkinen M., Partanen J., Sadeghi M., Veijola R., Knip M., Ilonen J., Hyöty H., Toppari J., Simell O., Hedman K., Söderlund-Venermo M. 2015. B-Cell Responses to Human Bocaviruses 1-4: New Insights from a Childhood Follow-Up Study. – *PloSOne*, 10(9):e0139096.

45. Kapikian A. Z., Wyatt R. G., Dolin R., Thornhill T. S., Kalica A. R., Chanock R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. - *Journal of Virology*, 10 (1972), pp. 1075–1081.
46. Kapoor A., Slikas E., Simmonds P., Chieochansin T., Naeem A., Shaukat S., Alam M. M., Sharif S., Angez M., Zaidi S., Delwart E. 2009. A new bocavirus species in human stool. – *The Journal of Infectious Diseases*, 199(2): 196–200.
47. 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.
48. Kerr J. R., Cotmore S. F., Bloom M. E., Linden M. R., Parrish C., editors. *Parvoviruses*. Boca Raton: Hodder Arnold; 2006.
49. 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.
50. Krakau M., Gerbershagen K., Frost U., Hinzke M., Brockmann M., Schildgen V., Gomann A., Limmroth V., Dormann A., Schildgen O. 2015. Case Report: Human Bocavirus Associated Pneumonia as Cause of Acute Injury, Cologne, Germany. - 94(42):e1587.
51. Lasure N., Gopalkrishna V. 2016. Molecular epidemiology and clinical severity of Human Bocavirus (HBoV) 1-4 in children with acute gastroenteritis from Pune, Western India. – *Journal of Medical Virology*, doi: 10.1002/jmv.24593.
52. 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.
53. Lehtoranta L., Söderlund-Venermo M., Nokso-Koivisto J., Toivola H., Blomgren K., Hatakka K., Poussa T., Korpela R., Pitkäranta A. 2012. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. – *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 76(2):206-11.
54. 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.

55. 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.
56. 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.
57. Linstow M. L., Høgh M., Høgh B. 2008. Clinical and Epidemiologic Characteristics of Human Bocavirus in Danish Infants. - *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10):897-902.
58. 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.
59. Lu X., Gooding L. R., Erdman D. D. 2008. Human bocavirus in tonsillar lymphocytes. – *Emerging Infectious Diseases journal*, 14 (8): 1332-1334.
60. Lüsebrink J., Wittleben F., Schildgen V., Shildgen O. 2009. Human Bocavirus – Insights into a Newly Identified Respiratory Virus. – *Viruses*, 1 (1): 3-12.
61. 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.
62. Madeley C. R., Cosgrove B. P. 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. – *The Lancet*, 2 (1975), pp. 451–452.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.

67. 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.
68. 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.
69. Nichols W. G., Campbell A. J. P., Boeckh M. 2008. Respiratory Viruses Other than Influenza Virus: Impact and Therapeutic Advances. – *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2): 274–290.
70. Ohshima T., Kawakami K., Abe T., Mochizuki M. 2010. A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. – *Veterinary Microbiology*, 145(3-4):334-8.
71. 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.
72. Pavia A. T. 2011. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and role of diagnosis. – *Clinical Infectious Diseases*, 52: S284-S289.
73. 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.
74. Pinky L., Dobrovolny H. M. 2016. Coinfections of the Respiratory Tract: Viral Competition for Resources. – *PloS One*, 11(5): e0155589.
75. 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.
76. Proença-Modena J. L., Bianca Gagliardi T. B., de Paula F. E., Iwamoto M. A., Criado M. F., Camara A. A. 2011. Detection of Human Bocavirus mRNA in Respiratory Secretions Correlates with High Viral Load and Concurrent Diarrhea. – *PlosOne*, v.6(6).
77. 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.
78. 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.

79. Romani S., Mohebbi S. R., Khanyaghma M., Azimzadeh P., Bozorgi S. M., Damavand B., Jadali F. 2013. Detection of human Bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis. – *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 6(Suppl 1):S77-81.
80. Roth D. E., Caulfield L. E., Ezzati M., Black R. E. 2008. Acute lower respiratory infections in childhood: opportunities for reducing the global burden through nutritional interventions. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86 Suppl 5:356-364.
81. Santos N., Peret T. C., Humphrey C. D., Albuquerque M. C., Silva R. C., Benati F. J., Lu X., Erdman D. D. 2010. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. – *Journal of Clinical Virology*, 48(2):127-30.
82. Shay D. K., Holman R. C., Newman R. D., Liu L. L., Stout J. W., Anderson L. J. 1999. Bronchiolitis-Associated Hospitalizations Among US Children, 1980-1996. – *The Journal of the American Medical Association*, 282(15):1440-1446.
83. Shen J., Zhu Q., Zeng M., Yu H. 2013. Detection and genome analysis of human bocavirus 1-4 from hospitalized children with acute lower respiratory tract infection and symptoms of wheezing in Shanghai. - *International Journal of Molecular Medicine*, 32(6):1415-20.
84. 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.
85. 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.
86. Schildgen O., Qiu J., Söderlund-Venermo M. 2012. Genomic features of the human bocaviruses. – *Future Virology*, 7(1):31-39.
87. 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.
88. Söderlund-Venermo M., Lahtinen A., Jartti T., Hedman L., Kempainen K., Lehtinen P., Allander T., Ruuskanen O., Hedman K. 2009. Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. – *Emerging Infectious Diseases*, 15(9):1423-30.
89. 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.

90. 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.
91. Tabasi M., Mokhtari-Azad T., Eshraghian M. R., Shadab A., Shatizadeh S., Nazanin Shafiei-Jandaghi Z., Yavarian J. 2016. Human bocavirus infections among children less than two years old in Iran during fall and winter 2012–2013. – *Iranian Journal of Microbiology*, 8(1): 80–84.
92. Tang M. B., Chu C. M., Chou Y. C., Kuan J. C., Yu C. P. 2015. Molecular detection of Human bocavirus 1 and 2 in children with acute gastroenteritis in Taiwan. - *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(6):1005-12.
93. 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.
94. Ursic T., Steyer A., Kopriva S., Kalan G., Krivec U., Petrovec M. 2011. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. - *Journal of Clinical Microbiology*, 49:1179–81.
95. Wang K., Wang W., Yan H., Ren P., Zhang J., Shen J., Deubel V. 2010. Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection. – *Journal of clinical virology*, 47(2):148-5.
96. Wilhelmi I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. - *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (4): 247–262.
97. Woensel J. B. M., Aalderen W. M. C., Kimpen J. L. L. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. 2003. – *TheBMJ*, 327(7405): 36–40.
98. 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.
99. Yesilbas O., Kılıtır H., Talip Petmezci M., Balkaya S., Hatipoğlu N., Mese S., Sevketoglu E. 2016. Very rare and life-threatening complications of bocavirus bronchiolitis: pneumomediastinum and bilateral pneumothorax. – *Mikrobioloji Bülteni*, 50(1):159-64.
100. Yu J. M., Chen Q. Q., Hao Y. X., Yu T., Zeng S. Z., Wu X. B., Zhang B., Duan Z. J. 2013. Identification of human bocaviruses in the cerebrospinal fluid of children hospitalized with encephalitis in China. – *Journal of Clinical Virology*, 57(4):374-7.
101. Zaghloul 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/199.html).

## **PIELIKUMI**

## Respiratoro vīrusu klātbūtne pacientiem ar dziļāko elpceļu slimībām

## Appendix 1

Presence of respiratory viruses in patients with lower respiratory tract diseases

<b>Virusi</b> <b>Pacienta nr.</b>	<b>HBov</b>	<b>RSVA</b>	<b>RSVB</b>	<b>Adv</b>	<b>HRV</b>	<b>MPV</b>	<b>PIV3</b>	<b>229E</b>	<b>HEV</b>	<b>OC43</b>	<b>NL63</b>	<b>FluA</b>	<b>FluB</b>	<b>pdm09</b>
B6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B14	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B19	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B20	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B23	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B24	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B28	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B30	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B31	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B33	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B35	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B36	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B37	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
B38	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B39	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Pacienta nr.	Virusi													
	HBoV	RSVA	RSVB	AdV	HRV	MPV	PIV3	229E	HEV	OC43	NL63	FluA	FluB	pdm09
B41	+	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
B46	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B47	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.
B48	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B49	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B51	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B52	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B53	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B57	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B59	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B60	+	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.
B61	+	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B62	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B63	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B65	+	+	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B71	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B72	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B76	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B104	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+
B105	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

## Kuņģa-zarnu trakta vīrusu klātbūtne pacientiem ar akūtu gastroenterītu

## Appendix 2

## Presence of gastrointestinal viruses in patients with acute gastroenteritis

<b>Vīrusi</b> <b>Pacienta nr.</b>	<b>ROV</b>	<b>NVG2</b>	<b>ADV-F</b>
B5	-	+	-
B8	+	+	-
B9*	-	-	-
B66	-	-	-
B67	-	-	-
B68	-	-	-
B69	-	+	-
B70	-	-	-
B73	-	-	-
B74	-	-	-
B77	-	-	-
B78	-	-	-
B79	-	+	-
B80	-	-	-
B81	-	-	-
B82*	-	-	-
B83*	-	-	-
B86	-	-	-
B87	+	-	+
B88	+	-	-
B91*	+	-	+
B92	+	-	-
B93	+	-	-
B94		+	+
B95	+	+	-
B96	+	-	-
B97	-	-	-

<b>Virusi</b> <b>Pacienta nr.</b>	<b>ROV</b>	<b>NVG2</b>	<b>ADV-F</b>
B99*	-	-	-
B100	+	-	-
B101	+	-	-
B103	+	-	-
B106	+	-	-
B107	-	-	-
B108*	+	-	-
B109	+	-	-
B110	-	+	-

\*Pacienti, kuriem DNS paraugā, kas izdalīts no fēcēm, konstatēta HBoV VP1/VP2 gēna sekvenču klātbūtne.

3. pielikums  
Zinātniskie raksti par darba tēmu  
Appendix 3  
Scientific articles on research topic

Nora-Krukle Z., Rasa S., Vilmane A., Gravelcina S., Kalis M., Ziemele I., Naciute M., Petraitiene S., Mieliauskaite D., Klimantaviciene M., Girkontaite I., Liu K. H., Lin J. H., Lin Y. C., Chan H. C., Gardovska D., Murovska M. Presence of human bocavirus 1 in hospitalized children with acute respiratory tract infections in Latvia and Lithuania. Manuskripts pieņemts publicēšanai Proceedings of the Latvian Academy of Sciences.

Ziemele I., Rasa S., Grāvelsiņa S., Vilmane A., Nora-Krūkle Z., Murovska M., Gardovska D. Cilvēka bokavīrusa 1.tipa klātbūtne hospitalizētiem bērniem ar akūtām elpceļu slimībām Latvijā. Manuskripts pieņemts publicēšanai RSU Zinātnisko Rakstu Krājums, Internā Medicīna, 2015.

Vilmane A., Rasa S., Ziemele I., Gardovska D., Murovska M., Nora-Krukle Z. Presence of human bocavirus 1 in hospitalized children with lower respiratory tract infection in Latvia. 18th Annual Meeting of European Society for Clinical Virology (ESCV), 9.-12. septembris, 2015, Edinburga, Lielbritānija.

Vilmane A., Ziemele I., Rasa S., Nora-Krūkle Z., Kālis M., Gardovska D., Murovska M. Cilvēka bokavīrusa pirmā tipa (HBoV1) klātbūtne un iesaiste akūtu dziļāko elpceļu slimību gadījumā hospitalizētiem bērniem. RSU zinātniskā konference, 26.-27. marts, 2015, Rīga, Latvija.

Ziemele I., Rasa S., Vilmane A., Hedman L., Arcu B., Hedman K., Söderlund-Venermo M., Kalis M., Murovska M., Nora-Krukle Z., Gardovska D. Human bocavirus 1 infection markers in children with acute lower respiratory tract disease in Latvia. The 33rd Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 12.-16. maijs, 2015, Leipciga, Vācija.

Siliņa E., Ziemele I., Rasa S., Vilmane A., Nora-Krūkle Z., Gardovska D., Murovska M. Association of acute lower respiratory tract infections with human bocavirus type-1 and other respiratory viruses in Latvia. RSU starptautiskā studentu konference, 17.-18. Marts, 2016, Rīga, Latvija.

Ziemele I., Hedman L., Arcu B., Rasa S., Vilmane A., Hedman K., Söderlund-Venermo M., Kalis M., Murovska M., Gardovska D., Nora-Krukle Z. Presence of human bocavirus 1-specific IgM and IgG class antibodies in children with acute respiratory tract infections in Latvia. The 1st Baltic Conference Immunological Modeling, 13.-15. maijs, 2015, Rīga, Latvija.

Maģistra darbs „Cilvēka bokavīrusa iesaiste dziļāko elpceļu slimību un akūta gastroenterīta patogēnēzē hospitalizētiem bērniem” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Anda Vilmane

14.06.2016.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. med. Zaiga Nora-Krūkle

14.06.2016.

Recenzents:

prof., Dr. biol. Indriķis Muižnieks

Darbs iesniegts Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā 10.06.2016.

Metodiķe: Dzintra Zaļā

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

14.06.2016. prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretāre: