Reinis Balmaks

**CILVĒKA RESPIRATORĀ SINCITIĀLĀ
VĪRUSA IZRAISĪTO DZIĻĀKO ELPCEĻU
INFEKCIJU KLĪNISKAIS UN
MOLEKULĀRAIS RAKSTUROJUMS
HOSPITALIZĒTIEM BĒRNIEM LATVIJĀ**

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – pediatrija

Rīga, 2014

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Reinis Balmaks

CILVĒKA RESPIRATORĀ SINCITIĀLĀ
VĪRUSA IZRAISĪTO DZIĻĀKO ELPCEĻU
INFEKCIJU KLĪNISKAIS UN
MOLEKULĀRAIS RAKSTUROJUMS
HOSPITALIZĒTIEM BĒRNIEM LATVIJĀ

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – pediatrija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med., profesore **Dace Gardovska**

Dr. biol. **Andris Kazāks**

Rīga, 2014

Finansējuma avoti

Ieguldījums tavā nākotnē!

1. Promocijas darbs izstrādāts ar ESF līdzfinansēta projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009, atbalstu.
2. Latvijas Republikas Izglītības un zinātnes ministrijas Studiju un zinātņu administrācijas grants 09.1604 „Dzīves kvalitāti Latvijā būtiski ietekmējošo atsevišķo mikroorganismu – *Borrelia burgdorferi sensu lato* kompleksa baktēriju, RSV un hMPV izraisīto slimību klīniskais, bioķīmiskais un molekulāri ģenētiskais raksturojums, personificēta pieeja diagnostikai un ārstēšanai, slimības gaitas prognozēšana”.

ANOTĀCIJA

Anotācija latviešu valodā

Cilvēka respiratorais sincitiālais vīruss (HRSV) ir īpašs izaicinājums bērnu infekciju slimībās. Pirmkārt, tas ir visbiežākais dziļāko elpceļu infekciju izraisītājs agrīna vecuma bērniem, kas šajā grupā ir vadošais mirstības un hospitalizācijas iemesls. Otrkārt, tam nav pieejama efektīva specifiskā ārstēšana. Treškārt, lai arī efektīva un droša vakcīna ir globāla prioritāte, tās izstrāde kavējas I fāzes klīniskajos pētījumos. Viens no tās izveides apgrūtinājumiem – ātrā vīrusa mainība – tika analizēts šajā pētījumā.

Trīs secīgu sezonu laikā pētījumā tika prospektīvi iekļauti 207 stacionēti bērni ar dziļāko elpceļu infekciju. Lai diagnosticētu HRSV un izšķirtu tā galvenās grupas, HRSV-A un B, šī pētījuma nolūkiem tika izstrādāta uz polimerāzes ķēdes reakciju balstīta metode, ar kuru 88 (42,5%) pētījuma pacientiem tika detektēta HRSV infekcija. HRSV epidemioloģiskās aktivitātes periods ilga no 51. līdz 19. gada nedēļai. Ikgadējo uzliesmojumu laikā HRSV izraisīja vairāk kā 90% bronholītu un 50% pneimoniju. Ar HRSV inficētie pacienti bija ievērojami jaunāki, un to vecums pārsvarā bija zem 6 mēnešiem. Ar molekulāro analīzi tika konstatēts, ka abu grupu vīrusi cirkulē paralēli, tomēr HRSV-A dominēja pirmajās divās sezonās, kurām sekoja HRSV-B dominanta sezona. Grupu ietvaros prevalēja viens genotips, NA1 (HRSV-A) un BA-IV (HRSV-B), kuri šajā laikā bija plaši izplatīti arī pasaulē. Statistiski ticamas klīniskās atšķirības starp dažādu grupu un genotipu izraisītajām infekcijām netika atrastas. 2012. gadā Latvijā tika konstatēts nesen atklātais HRSV-A genotips ON1, kuram raksturīgā 72 nukleotīdu duplikācija G gēnā tika izmantota, lai rekonstruētu tā globālo izplatību un populācijas dinamiku.

Šis ir pirmais HRSV molekulārās epidemioloģijas pētījums Latvijā un tam ir gan lokāla, gan globāla zinātniskā novitāte. Tas aktualizē precīzu HRSV sezonālītātes datu nepieciešamību Latvijā. Tika atklāti vairāki jauni HRSV celmi, kuru sekvences ir deponētas GenBank datu bāzē. Šis pētījums ir pirmais, kas izvirza genotipa ON1 migrēšanas hipotēzi un populācijas dinamikas aplēses. Iegūtie dati var tikt izmantoti optimālākai imūnprofilakses pielietošanai riska grupas zīdaiņiem Latvijā un globālo sabiedrības veselības stratēģiju plānošanā.

Summary in English

Human respiratory syncytial virus (HRSV) represents a particular challenge in pediatric infectious diseases. First, it is the most common etiologic agent of lower respiratory tract infections in infants and young children, which is the leading cause of hospitalization and mortality in this age group. Second, there is no effective specific treatment available. Third, although effective and safe vaccine is a global priority, its research is still in phase I clinical trials. One of the challenges in vaccine development, the high variability of the virus, was addressed in this study.

A total of 207 hospitalized children with lower respiratory tract infections were prospectively enrolled in the study over three consecutive seasons. For HRSV diagnosis and group, HRSV-A and B, differentiation a polymerase chain reaction based method was developed that tested positive 88 (42.5%) of the patients. The seasonal activity lasted from weeks 51 to 19. During the annual outbreaks, HRSV caused more than 90% of bronchiolitis and 50% of pneumonia. Children with HRSV lower respiratory tract infection were significantly younger than those with non-HRSV and were mostly less than 6-month-old. Molecular analysis revealed that the strains of both groups co-circulated, however HRSV-A viruses predominated for the first two consecutive seasons followed by an HRSV-B dominant season. Within the groups, viruses belonged to the worldwide dominant genotypes NA1 (HRSV-A) and BA-IV (HRSV-B). Clinical characteristics of infections caused by the different groups or genotypes were not statistically significant. In 2012, recently described HRSV-A genotype ON1 emerged in Latvia. Its characteristic 72-nucleotide duplication in the G gene was exploited to reconstruct the global spread and population dynamics of this genotype.

This is the first molecular epidemiologic study of HRSV in Latvia and it has several important findings. It emphasizes the need for precise HRSV seasonality data. In this study several new HRSV strains were detected and deposited in GenBank database. This is also the first study suggesting a hypothesis of the global dissemination and population dynamics of the novel genotype ON1. The data presented here can be used to optimize timing of immunoprophylaxis in the high-risk infants in Latvia and to develop global public health interventions.

SATURS

Ievads	10
Darba mērķis.....	11
Darba uzdevumi	12
Darba hipotēzes.....	12
1. Literatūras apskats	13
1.1. Virālo dziļāko elpceļu infekciju slogs bērniem.....	13
1.2. HRSV raksturojums	16
1.2.1. Epidemioloģija.....	16
1.2.2. Virusoloģiskais raksturojums	17
1.2.3. Klīniskās izpausmes.....	19
1.2.4. Ārstēšana.....	21
1.2.5. Profilakse	24
1.3. HRSV molekulārā epidemioloģija	25
1.3.1. HRSV galvenās antigēnās grupas	25
1.3.2. HRSV genotipi.....	25
1.3.3. HRSV virsmas glikoproteīns G	27
1.4. Evolūcijas analīzes metodes.....	29
2. Metodes	34
2.1. Pētījuma populācija.....	35
2.2. Klīniskie paraugi	36
2.3. HRSV diagnostika, grupu diferencēšana, sekvenēšana	37
2.3.1. cDNS sintēze.....	37
2.3.2. HRSV diagnostika un grupu diferencēšana	38
2.3.3. DNS sekvenēšana	39

2.4.	Filoģenēzes un adaptīvās evolūcijas analīze	39
2.4.1.	Filoģenētiskā analīze.....	39
2.4.2.	Glikozilācijas vietu prognozēšana	40
2.4.3.	Dabīgā atlase.....	40
2.5.	Evolūcijas ātrums, populācijas dinamika un filoģeogrāfiskā analīze	41
2.6.	Datu statistiskā apstrāde	42
2.6.1.	HRSV sezonālītātes datu statistiskā apstrāde	42
2.6.2.	Klīnisko datu statistiskā apstrāde.....	43
3.	Rezultāti.....	44
3.1.	HRSV klīniskais raksturojums.....	44
3.1.1.	Pētījuma pamatgrupa	44
3.1.2.	HRSV diagnostika un grupu diferencēšana	44
3.1.3.	HRSV sezonālītāte.....	46
3.1.4.	HRSV klīniskās pazīmes	48
3.2.	HRSV molekulārais raksturojums.....	52
3.2.1.	Filoģenētiskā analīze.....	52
3.2.2.	Genotipa NA1 molekulārais raksturojums	57
3.2.3.	Genotipa BA-IV molekulārais raksturojums	61
3.2.4.	Genotipa ON1 globālā filodinamika un filoģeogrāfija	63
4.	Diskusija.....	67
4.1.	Pētījuma pamatgrupa.....	67
4.2.	HRSV diagnostika.....	67
4.3.	HRSV sezonālītāte	69
4.4.	HRSV klīnisko pazīmju raksturojums	71
4.5.	HRSV grupu un genotipu klīniskais raksturojums.....	73

4.6.	HRSV celmu molekulārā analīze	74
4.7.	HRSV celmu globālā diseminācija	81
4.8.	Pētījuma datu interpretācijas ierobežojumi	85
5.	Secinājumi	87
6.	Praktiskās rekomendācijas	88
7.	Autora publikācijas un ziņojumi	89
7.1.	Publikācijas	89
7.2.	Ziņojumi kongresos un konferencēs	89
8.	Pateicības	91
9.	Izmantotā literatūra	92
10.	Pielikumi	108

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Apzīmējums	Skaidrojums
95% HPD	95% augstākās varbūtības blīvums
aa	Aminoskābe(s)
BKUS	Valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību „Bērnu klīniskā universitātes slimnīca” Torņakalna novietne
bp	Bāžu pāri
BSP	Baijesa apvēršņa grafiks
cDNS	Komplementārā DNS
<i>dN</i>	Ne-sinonīma mutācija – kodējošās sekvences nukleotīda nomaiņa, kuras rezultātā aminoskābju sekvence mainās
<i>dN/dS</i>	Ne-sinonīmo/sinonīmo mutāciju attiecība
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe
<i>dS</i>	Sinonīma mutācija – kodējošās sekvences nukleotīda nomaiņa, kuras rezultātā nemainās aminoskābju sekvence
dsDNS	Dubultpavediena DNS
FEL	Nemainīgas ietekmes patīcamības metode selekcijas spiediena noteikšanai
Fr	Francijas kateteru skalas mērvienība (1 Fr katetram ir 1/3 mm diametrs)
HRSV	Cilvēka respiratorais sincitiālais vīruss
HRSV-A	A grupas cilvēka respiratorais sincitiālais vīruss, viena no divām galvenajām antigēnajām grupām
HRSV-B	B grupas cilvēka respiratorais sincitiālais vīruss, viena no divām galvenajām antigēnajām grupām
HVR	Hipervariablais reģions
IFA	Imūnfluorescences tests
IFEL	Iekšējās nemainīgās ietekmes patīcamības metode selekcijas spiediena noteikšanai
IV	Intravenozs(i)
kB	Kilobāze(s); 1000 bāžu pāri
KSS	Klīniskā smaguma skala

LIC	SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” stacionārs „Latvijas Infektoloģijas centrs”
MCC	Maksimālās radniecības ticamības filoģenētiskais koks
MCMC	Markova ķēdes Montekarlo algoritms
MEME	Dažādu ietekmju molekulārās evolūcijas metode selekcijas spiediena noteikšanai
MIP 1 α	Makrofāgu iekaisīgais proteīns 1 α
ML	Maksimālās patīcamības metode
Ne	Efektīvās populācijas izmērs
NFA	Nazofaringeālais aspirāts
NJ	<i>Neighbor-joining</i> ātrās klasterizācijas algoritms
nt	Nukleotīds(i)
PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija
pmol	Pikomols
PVO	Pasaules Veselības organizācija
RDNI	Respiratorā distresa novērtēšanas instruments
REL	Nejaušas ietekmes patīcamības metode selekcijas spiediena noteikšanai
RNP	Ribonukleoproteīns
RNS	Ribonukleīnskābe
RT-PCR	Apgrieztās (reversās) transkripcijas PCR
SD	Standartnovirze
SIRS	Sistēmiska iekaisuma atbildes sindroms
SLAC	Vienas patīcamības ciltstēvu skaitīšanas metode selekcijas spiediena noteikšanai
SPKC	Slimību profilakses un kontroles centrs
ssDNS	Vienpavediena DNS
ssRNS	Vienpavediena RNS
tMRCA	Kopīgā ciltstēva laiks
π	Nukleotīdu polimorfisms (vidējais nukleotīdu nomaiņu skaits novietojumā)
τ	Paaudzes ilgumu gados

IEVADS

Smaga respiratora infekcija zīdaiņiem, kas atbilst cilvēka respiratorajam sincitiālajam vīrusam (HRSV¹), tika aprakstīta jau vairāk kā pirms 150 gadiem [Black, 2003]. Retrospektīvi pētot patoloģisko materiālu arhīvus, senākā patoloģiskās anatomijas liecība ir atrasta 1931. gadā pagatavotā priekšmetstiklīnā [Johnson et al., 2007]. Adams aprakstīja akūtas dziļāko elpceļu infekciju uzliesmojumu zīdaiņu aprūpes iestādē 1937. gadā, viņš arī izteica hipotēzi par tās virālo etioloģiju un sezonalitāti [Adams, 1941]. HRSV pirmo reizi tika izolēts 1956. gadā no šimpanzes ar elpceļu saslimšanu un sākotnēji tika dēvēts par „šimpanzes iesnu aģentu”² [Morris et al., 1956]. Jau gadu vēlāk tas tika izdalīts arī no bērna ar respiratoru infekciju [Chanock and Finberg, 1957], bet savu pašreizējo nosaukumu tas ieguva pēc patoloģisko izmaiņu apraksta elpceļu šūnās. Turpmākajos gados tika atklāts, ka HRSV ir visbiežākais virālais dziļāko elpceļu infekciju ierosinātājs bērniem ar lielu mirstību jaunattīstības valstīs un milzīgu ekonomisko slogu veselības finansējumam visā pasaulē. Pēdējos gados ir apzināta arī liela morbiditāte un mortalitāte augsta riska pieaugušo un vecu ļaužu populācijās, kur mirstība ir pat lielāka kā bērnu populācijā [Falsey et al., 2005].

Mitrināta skābekļa terapija cianotiskiem pacientiem un hidratācija tiek rekomendēta HRSV dziļāko elpceļu infekcijas ārstēšanā kopš 60. gadiem [Reynolds and Cook, 1963] un mūsdienās terapija, būtībā, nav daudz mainījusies [American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006; Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2006]. Bērnu mirstības samazināšanās no HRSV infekcijas attīstītajās valstīs ir galvenokārt saistīta ar vispārīgu medicīnas attīstību. Pasaulē kopš 1998. gada augsta riska zīdaiņiem ir pieejama imūnprofilakse ar monoklonālo antivielu palivizumabu, kas Latvijā tiek lietots kopš 2009. gada [Perevoščikovs un Lucenko, 2010]. Tomēr šī preparāta dārdzība (viena flakona cena ir LVL 955, t.i. gandrīz 5000 LVL sezonā vienam pacientam; <http://www.zva.gov.lv>) ierobežo pielietošanu plašākai populācijai [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases,

¹ Human respiratory syncytial virus.

² Chimpanzee coryza agent.

2009]. Lai arī vakcīna ir medicīniska nepieciešamība un būtu ekonomiski izdevīga [Meijboom et al., 2012], gandrīz 50 gadu laikā tā arī nav izdevies radīt licencētu produktu [Anderson et al., 2013]. Patiesībā, HRSV pētniecības vēsture ir saistīta ar vienu no neveiksmīgākajiem vakcinācijas mēģinājumiem pediatrijā [Black, 2003]. 1966. gadā ASV tika veikta bērnu imunizācija ar polivalentu vakcīnu, kas saturēja formalinā inaktivētu HRSV. Šī vakcīna ne tikai nepasargāja no infekcijas, bet 80% ar HRSV inficēto bērnu tika stacionēti un divi no viņiem nomira, kamēr placebo grupā stacionēti tika tikai 5% un netika konstatēti nāves gadījumi.

Drošas vakcīnas izstrādāšana un ieviešana ir viena no globālajām prioritātēm. Šo uzdevumu būtiski apgrūtina HRSV lielā ģenētiskā mainība. Vienlaicīgi cirkulē vairāki HRSV genotipi, kurus periodiski nomaina jauni. Genotipu izplatība ir sarežģīta, jo vīrusa celmi īsā laika periodā spēj šķērsot plašas ģeogrāfiskās robežas. Reģionālai HRSV molekulārajai uzraudzībai ir būtiska nozīme HRSV virusoloģisko īpašību izpētē, jaunu virulences faktoru prognozēšanā, diagnostisko testu izstrādē un populācijai piemērotu vakcīnu celmu selekcijā. Apkopojot vietējos un globālos datus, ir iespējams rekonstruēt vīrusa populācijas izmēra pārmaiņas un ģeogrāfisko izplatību, kas ļauj identificēt epidēmijas izplatīšanās ceļus un veicināt sabiedrības veselības stratēģiju izstrādāšanu. Latvijā HRSV epidemioloģija ir vāji apzināta – tā incidence un slimības slogs nav zināmi, pieejamie dati rada tikai aptuvenu priekšstatu. Latvijā cirkulējošo HRSV celmu molekulārā struktūra iepriekš nav pētīta.

Darba mērķis

Raksturot HRSV izraisīto dziļāko elpceļu infekciju klīniskās īpatnības un terciārā līmeņa bērnu slimnīcā cirkulējošo celmu molekulāro epidemioloģiju trīs secīgu respiratoro vīrusu sezonu laikā Latvijā.

Darba uzdevumi

1. Izstrādāt polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) testu HRSV diagnostikai un ģenētisko grupu diferencēšanai;
2. noteikt HRSV izplatību stacionētiem agrīna vecuma bērniem ar dziļāko elpceļu infekciju;
3. izpētīt HRSV sezonalitāti trīs gadu laikā;
4. noteikt HRSV grupu un genotipu iespējamo saistību ar to izraisītās infekcijas smagumu;
5. analizēt HRSV celmu filoģenēzi un mainību;
6. izmantojot G gēna ģealoģiju, rekonstruēt HRSV demogrāfiskās un ģeogrāfiskās izkliedes parametrus.

Darba hipotēzes

1. HRSV molekulārā epidemioloģija Latvijā būtiski neatšķiras no citām valstīm, tomēr pastāv lokālo celmu iespējamība;
2. pastāv korelācija starp HRSV molekulāro raksturojumu un slimības norises smagumu;
3. pielietojot molekulārā pulksteņa principu ar izolēšanas laiku un vietu iezīmētām HRSV genoma sekvencēm, iespējams rekonstruēt tā globālo izplatību.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Virālo dziļāko elpceļu infekciju slogs bērniem

Akūtas dziļāko elpceļu infekcijas ir galvenais nāves cēlonis agrīna vecuma bērniem pasaulē. Pasaules Veselības organizācijas (PVO) cēlonis specifiskās mirstības sadalījumā bērniem vecumā līdz pieciem gadiem 2010. gadā pneimonija bija vadošais nāves cēlonis; tā bija izraisīja 19% jeb 1,4 miljonus nāves gadījumu šajā vecuma grupā [World Health Organization, 2012]. Lai arī kopš 1990. gada mirstību no šīm infekcijām ir izdevies ievērojami samazināt, tā joprojām ir galvenais šķērslis, lai sasniegtu Apvienoto Nāciju Organizācijas Tūkstošgades attīstības 4. mērķi – samazināt bērnu mirstību par divām trešdaļām līdz 2015. gadam [Lozano et al., 2012; United Nations, 2012; http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/en/]. Dziļāko elpceļu infekcijas mirstības etioloģijā pasaulē vadošā loma ir diviem bakteriāliem patogēniem *Streptococcus pneumoniae* un *Haemophilus influenzae*, kam seko HRSV un vairāki citi virāli aģenti, galvenokārt masalu vīruss un gripas vīrusi A un B [Lozano et al., 2012; Nair et al., 2010; Rudan et al., 2008]. 70% no dziļāko elpceļu infekcijas nāves gadījumiem ir lokalizēti Subsahāras Āfrikā un Dienvidaustrumāzijā, kur šo mirstību būtiski ietekmē tādi blakus faktori kā malnutricija un imunizācijas trūkums [Roth et al., 2008; Rudan et al., 2008].

Pielietojot molekulārās tehnoloģijas, mūsdienās viens vai vairāki virālie aģenti tiek detektēti līdz pat 95% bērnu ar bronhiolītu un līdz pat 72% bērnu ar pneimoniju [Jartti et al., 2013]. Attīstītajās valstīs bērnu mirstība no vīrusu izraisītas dziļāko elpceļu infekcijas ir zema. Tomēr kā visbiežākais agrīna vecuma bērnu hospitalizācijas iemesls [Shay et al., 1999], tās rada būtisku sociālo un ekonomisko slogu. Katru gadu 3–10% no visiem bērniem jaunākiem par vienu gadu tiek stacionēti ar vidēji smagu vai smagu dziļāko elpceļu infekciju [Henrickson et al., 2004; Shay et al., 1999]. Aptuveni vienai trešdaļai stacionēto bērnu ir hroniskas medicīniskas problēmas, visbiežāk, neiznestība, imūnsupresija vai kardiopulmonāla slimība [Henrickson et al., 2004]. ASV ar bronhiolītu stacionēto bērnu vecumā līdz diviem gadiem tiešās medicīniskās izmaksas ik gadu pārsniedz 500 miljonu dolāru, turklāt pacienta individuālās izmaksas ir divkārt lielākas, ja tiek diagnosticēta pneimonija [Pelletier et al., 2006]. Kopējais ekonomiskais slogs, ierēķinot ambulatorās un

uzņemšanas nodaļu izmaksas, kā arī vecāku kavētās darbadienas, ir aptuveni piecas reizes lielāks [Leader and Kohlhase, 2003].

Neskatoties uz kopīgajām slimības izpausmēm, cilvēkam patogēni ir vismaz 26 respiratorie vīrusi [Ruuskanen et al., 2011], kas pieder dažādām vīrusu kārtām un ir ģenētiski un imunoloģiski atšķirīgi. 1.1. tabulā uzskaitīti galvenie respiratorie vīrusi, kas ir asociēti ar dziļāko elpceļu infekciju, kā arī norādīta to klasifikācija. Pēdējo gadu laikā, attīstoties molekulārajām tehnoloģijām, ir radīti vairāki *multiplex* diagnostiskie paneļi, kas ļauj noteikt pat 15 un vairāk ierosinātājus vienlaicīgi. Šādi diagnostiskie instrumenti ar augstu jutību ļauj noteikt kultūrās grūti izolējamu vīrusu (piem., cilvēka rinovīrusa) genoma klātbūtni un samazināt nediferencētu dziļāko elpceļu infekciju skaitu līdz dažiem procentiem [Jartti et al., 2013]. Tādējādi iespējams samazināt antibakteriālo līdzekļu patēriņu un panākt labāku pacientu kohortēšanu slimnīcā, mazinot intrahospitālās pārneses risku. Tomēr šādam plašam skrīningam ir arī vairāki trūkumi: nereti vīrusu (īpaši cilvēka rinovīrusa un bokavīrusa) klātbūtne tiek noteikta asimptomātiskiem bērniem (līdz pat 68% gadījumu), un ne visu jaunatklāto vīrusu (cilvēka koronavīrusi un bokavīruss) kauzalitāte ir labi pierādīta [Jartti et al., 2013; Pavia, 2011].

Dzilāko elpceļu infekciju virālo ierosinātāju klasifikācija [Wang et al., 2012]

Kārta	Dzimta	Genoma uzbūve ^a	Apvalks ^b	Pārstāvji	Prevalence ^c
<i>Mononegalovirales</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	ssRNS (-)	RNS vīrusi +	HRSV Cilvēka metapneimovīruss Paragripas vīrusi 1–4	10–30% 1,5–30% 15–30%
Nav piešķirta <i>Picornavirales</i>	<i>Orthomyxoviridae</i> <i>Picornaviridae</i>	ssRNS (-), segmentēts ssRNS (+)	+	Gripas vīrusi A un B Cilvēka rinovīrusi un enterovīrusi	6–40% 12–45%
<i>Nidovirales</i>	<i>Coronaviridae</i>	ssRNS (+)	+	Koronavīrusi: 229E OC43 HKU1 NL63 SARS ^d	1–5% 5–30% 1–11% 2–9% Izolēta epidēmija 2002.g.
Nav piešķirta Nav piešķirta	<i>Adenoviridae</i> <i>Parvoviridae</i>	dsDNS ssDNS (+/-)	DNS vīrusi -	Cilvēka adenovīrusi Cilvēka bokavīruss	2–4% 2–11%

^a ssRNS – vienpavediena RNS; dsDNS – dubulpavediena DNS; ssDNS – vienpavediena DNS; ar (+) un (-) norādīta genoma polaritāte attiecīgi pozitīva vai negatīva.^b apvalkotī vīrusi norādīti ar (+), vīrusi bez apvalka ar (-).^c prevalence respiratoro vīrusu struktūrā pēc [Mahony, 2008].^d Smaga akūta respiratorā sindroma koronavīruss.

1.2. HRSV raksturojums

1.2.1. Epidemioloģija

Pēc epidemioloģiskiem aprēķiniem HRSV katru gadu pasaulē izraisa aptuveni 33,8 miljonus jaunas infekcijas bērniem vecumā līdz pieciem gadiem [Nair et al., 2010]. Apmēram 10% inficēto bērnu attīstās smaga dziļāko elpceļu infekcija, kuriem nepieciešama hospitalizācija, un kopējā ikgadējā mirstība šajā vecumā tiek lēsta ap 234000 [Lozano et al., 2012], t.i. HRSV ir ierosinātājs vairāk nekā 15% gadījumos, kad bērna nāves iemesls ir dziļāko elpceļu infekcija. Kopējā gadījuma mirstība no HRSV izraisītās dziļāko elpceļu infekcijas jaunattīstība valstīs ir 2,1% [Nair et al., 2013]. Lielāku mirstību šajā vecuma un diagnozes grupā izraisa tikai *Streptococcus pneumoniae* un *Haemophilus influenzae* b tips. 99% no šiem nāves gadījumiem ir reģistrēti jaunattīstības valstīs [Nair et al., 2010]. Industrializētajās valstīs gadījuma mirstība no HRSV dziļāko elpceļu infekcijas ir aptuveni septiņas reizes mazāka – 0,3% [Nair et al., 2010], bet populācijas mērogā bērniem zem viena un piecu gadu vecuma tā ir attiecīgi 3,1 un 0,1 uz 100000 persongadiem, hospitalizētiem pacientiem tā ir <1% [Leader and Kohlhasse, 2003; Thompson et al., 2003]. Mirstība ir vairāk nekā trīs reizes augstāka pacientiem ar pavadošām slimībām, galvenokārt neiznestību, hemodinamiski nozīmīgu iedzimtu sirdskaiti (īpaši gadījumos, kad tā saistīta ar plaušu hipertensiju) un hronisku plaušu slimību (saistībā ar neiznestību, cistiskā fibroze u.c.) [Shay et al., 2001].

Ikgadējie uzliesmojumi ir saistīti ar milzīgu slogu veselības budžetam. Līdz gada vecumam ar HRSV inficējas aptuveni 70% bērnu, bet līdz divu gadu vecumam – vairāk kā 90% [Glezen et al., 1986; Simões and Carbonell-Estrany, 2003]. HRSV konstatē aptuveni 45% no hospitalizētiem bērniem ar dziļāko elpceļu infekciju, kas jaunāki par diviem gadiem [Simões and Carbonell-Estrany, 2003]. Neiznestība un jaunāks vecums (zem sešiem mēnešiem) ir neatkarīgi riska faktori hospitalizācijai [Hall et al., 2009]. Citi aprakstītie riska faktori, kas saistīti ar hospitalizāciju, ir vīriešu dzimums, hroniskas blakus slimības, zems sociāli ekonomiskais stāvoklis, pasīvā smēķēšana, īsāks krūts ēdināšanas periods un kontakts ar citiem bērniem ģimenē [Holberg et al., 1991; Nielsen et al., 2003]. Tomēr absolūti lielākā daļa hospitalizēto bērnu ir bijuši iepriekš veseli [Hall et al., 2009].

Pēdējos gados hospitalizācijas biežums sakarā ar HRSV izraisītu bronhiolītu pieaug, ko visticamāk veicinājusi plaša pulsoksimetrijas pielietošana, lai identificētu hipoksēmiskus pacientus [García et al., 2010].

Vecāki ļaudis un pieaugušie ar hroniskām kardiopulmonālām slimībām un imūnsupresēti indivīdi arī ietilpst smagas HRSV infekcijas riska grupā [Falsey et al., 2005]. Patiesībā, 88% ar HRSV asociēto nāves gadījumu ir vecuma grupā virs 65 gadiem [Thompson et al., 2003]. ASV ar HRSV ik gadu inficējas 5–10% pansionātu iemītnieki un gadījuma mirstība sasniedz 2–8% [Falsey et al., 2000].

Lai arī HRSV ir tikai viens serotips, pēc infekcijas neizveidojas pasargājoša imunitāte, tāpēc dzīves un pat vienas sezonas laikā ir iespējams inficēties atkārtoti [Henderson et al., 1979; Simões, 1999; Simões and Carbonell-Estrany, 2003].

Vēl viens būtisks HRSV epidemioloģiskais aspekts ir nozokomiālā pārnese, kuras pamatā ir tā augstā kontagiozitāte; tas ir viens no biežākajiem nozokomiālo infekciju aģentiem pediatrikajās nodaļās. Intrahospitālā HRSV infekcija ir saistīta ar ievērojami ilgāku uzturēšanos slimnīcā un lielāku mirstību, salīdzinot ar sadzīvē iegūtu infekciju [Langley et al., 1997]. Slimnīcas personāls ir galvenais infekcijas avots. Lai arī lielākajai daļai medicīniskā personāla ir saaukstēšanās simptomi, 15–20% inficēto darbinieku var būt asimptomātiski [Hall, 2000]. Vīrusa nukleīnskābi var atrast arī uz priekšmetiem inficēto pacientu palātās [Geis et al., 2013].

Latvijā HRSV epidemioloģiskās uzraudzības dati ir skopi – Slimību profilakses un kontroles centra Epidemioloģijas Biļetens ziņo tikai kopējo HRSV pozitīvi testēto paraugu skaitu pa epidemioloģiskajām nedēļām, neizdalot tos pa vecuma un diagnožu grupām un bez populācijas saucēja [Nikiforova un Pumane, 2013]. Ir zināms, ka HRSV īpatsvars starp pārbaudītajiem respiratorajiem vīrusiem Latvijā pēdējos gados ir bijis no 15–47% [Nikiforova et al., 2011]. Incidences, mirstības un sezonalitātes dati nav zināmi.

1.2.2. Virusoloģiskais raksturojums

HRSV ir klasificēts *Pneumovirus* ģintī, *Pneumovirinae* apakšdzimtā, *Paramyxoviridae* dzimtā. Atbilstoši tas ir citoplazmatisks apvalkots vīruss ar vienas

molekulas, lineāru, negatīvas ssRNS genomu, kas neveido rekombinācijas [Wang et al., 2012]. HRSV virioni ir pleomorfi ar sfērisku (lielākā daļa) vai filamentozu (aptuveni 5%) formu, vai abu kombināciju, izmērā no 100 līdz 1000 nm [Liljeroos et al., 2013]. HRSV virālā RNS ir aptuveni 15,2 kB gara un tās 10 gēni kodē 11 proteīnus [Collins and Crowe, 2007]: 9 no tiem ir strukturālie un virsmas glikoproteīni, atlikušie 2 ir iesaistīti replikācijas regulēšanā (1.1. attēls).

1.1. att. HRSV genoma uzbūve

A, viriona shēma [Melero, 2007]; B, genoma shēma. Nukleoproteīns N ir cieši saistīts ar genoma RNS; L proteīns ir galvenā polimerāzes subvienība; fosfoproteīns P ir nozīmīgs kofaktors RNS sintēzē; M2-1 un M2-2 proteīni regulē RNS transkripciju; matricas M proteīns veido vīrusa iekšējo apvalku; glikozilētais G, fūzijas F un mazais hidrofobais SH ir virsmas glikoproteīni; NS1 un NS2 ir nestrukturālie proteīni, un tiem ir loma imūnās atbildes nomākšanā [Collins and Graham, 2008].

Lai inficētu šūnas, vīruss izmanto virsmas glikoproteīnus G un F, kuriem nepiemīt neiraminidāzes un hemaglutinīna aktivitātes. Šie proteīni ir arī primārie neitralizējošo antivielu mērķi un lielā mērā nosaka vīrusa infekciozitāti un patogēnēzi [Connors et al., 1991]. G proteīns nodrošina vīrusa pieķeršanos mērķa šūnai, un tas ir antigēni un ģenētiski vismainīgākais HRSV proteīns [Sullender, 2000]. F proteīns nodrošina vīrusa un mērķa šūnas plazmatiskās membrānas saplūšanu, vīrusam nokļūstot šūnas citoplazmā. F proteīns spēlē lomu raksturīgo sincītijū (daudzkodolainu agregātu, ko veido šūnas ar saplūdušām plazmatiskajām membrānām) formēšanā šūnu kultūrās [Peters and Crowe, 2008]. HRSV membrānā ir inkorporēti arī mazais hidrofobais glikoproteīns SH, kura funkcija nav zināma, un celulārie proteīni tādi kā aktīns un šaperoni [Liljeroosa et al., 2013]. Virālā RNS nonāk šūnas citoplazmā kā spirālveida ribonukleoproteīnu (RNP) komplekss, to veido viena molekula RNS, kuru ieskauj nukleoproteīni N un RNS atkarīgā RNS polimerāze [Tawar et al., 2009]. Šāds komplekss, iespējams, samazina *toll-like* receptoru (TLR) virālās RNS atpazīšanu. Vēl virionā atrodas matricas proteīns M un transkripcijas antiterminators M2-1, ar apvalku saistīts proteīns, kas mediē RNP saistību ar M proteīnu [Liljeroosa et al., 2013]. Virālo gēnu ekspresija norit šūnas citoplazmā, bet lipīdu apvalku virioni iegūst, pumpurojoties no citoplazmatiskās membrānas [Collins and Graham, 2008].

1.2.3. Klīniskās izpausmes

HRSV izraisa stabilus, prognozējamus ikgadējus uzliesmojumus, kas mērenajā klimata joslā sakrīt ar ziemas un pavasara (novembris – aprīlis), bet tropiskajā klimata joslā ar lietuss sezonas mēnešiem (maijs – decembris) [Bloom-Feshbach et al., 2013; Langley et al., 2013]. Lai arī atšķirīgu iemeslu dēļ, šie ir periodi, kad bērni pārsvarā pulcējās iekšējās telpās. Infekcijas tropisms parasti ir ierobežots ar virsmas epitēlija šūnām. HRSV RNS ir izdalīta arī no asinīm [O'Donnell et al., 1998], miokarda [Bowles et al., 2003], aknām [Nadal et al., 1990] un cerebrospinālā šķidruma [Zlateva and van Ranst, 2004], tomēr tiešs vīrusa izraisīts iekaisums šajos orgānos nav pierādīts. Vīrusa inokulācija degunā vai acīs notiek gaisa-pilienu vai tieša kontakta ceļā, pēc kā norit vīrusa replikācija aizdegunē ar inkubācijas periodu no 3 līdz 5 dienām [Collins and Crowe, 2007]. Biežākās slimības

sākuma izpausmes ir rinīts, klepus un subfebrila temperatūra. Bieža infekcijas komplikācija ir vidusauss iekaisums – līdz pat 70% inficēto pacientu vīruss izolējams arī no vidusauss šķidruma ar vai bez bakteriālas ko-infekcijas [Andrade et al., 1998; Fleming et al., 2005; Heikkinen and Ruuskanen, 1995; Heikkinen et al., 1999]. Gandrīz pusei pirmreizēji inficēto zīdaiņu vīruss nākamajās dienās izplatās tālāk uz dziļākajiem elpceļiem. Bronhiolu skropstiņepitēlijs un 1. tipa alveolocīti ir primārais mērķis dziļākajos elpceļos [Johnson et al., 2007]. Šeit epitēlija šūnu nekroze, intralumināls nosprostojums ar atmirušajiem audiem, gļotām un eksudātu, bronhiolu sienīgas tūska un bronhospazma rada ventiļa efektu ar perifēro plaušu daļu hiperventilāciju un atelektāzēm [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006; Pipavath et al., 2005]. Dziļāko elpceļu infekciju klīniski raksturo atteikšanās no ēdiena un palielināts elpošanas darbs, ko raksturo ātra elpošana, elpošanas palīgmuskulatūras iesaiste, stenēšana un deguna spārnu cilāšanās [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006; Hall et al., 2009; Wennergren and Kristjánsson, 2001]. Pacientiem ar bronhiolītu ir raksturīga palielināta elpceļu pretestība ar “gāzes lamatām”, kas klīniski izpaužas kā sēkšana (gan auskultējama, gan *per distance*) ar pagarinātu izelpu, virs plaušu laukiem auskultējami arī mitri trokšņi. Lai arī diagnozes noteikšanai pietiek ar anamnēzi un klīniskajām izpausmēm [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006], ja tiek veikta krūškurvja rentgenogramma, tajā ir redzama plaušu hiperinflācija, peribronhiāli sabiezējumi un segmentāras atelektāzes [Peters and Crowe, 2008]. Pacientiem ar pneimoniju auskultējamās krepitācijas un radioloģiski atrodama alveolāra, segmentāra vai lobāra konsolidācija. Gan bronhiolīts, gan pneimonija var izraisīt hipoksēmiju, kas bieži atrodama HRSV inficētiem pacientiem, veicot pulsoksimetriju [Collins and Graham, 2008; Simões, 1999]. Hipoksēmija stacionēšanas brīdī, kuru izraisa plaušu ventilācijas-perfūzijas neatbilstība bronhiolīta gadījumā vai intrapulmonālais šunts pneimonijas gadījumā, ir visbūtiskākais prognostiskais faktors komplikētai slimības gaitai – ilgākai hospitalizācijai, uzņemšanai intensīvās terapijas nodaļā un mākslīgajai plaušu ventilācijai [Shaw et al., 1991; Wang et al., 1995]. Bakteriāla superinfekcija attīstītajās valstīs ir reta, tā biežāk sastopama mazattīstītajās valstīs, kas ir viens no izskaidrojumiem palielinātai mirstībai [Nair et al., 2010; Simões, 1999]. Salīdzinoši retāka (1% no hospitalizētajiem bērniem), bet potenciāli

dzīvībai bīstama izpausme, apnoja, ir sastopama par diviem mēnešiem jaunākiem zīdaiņiem [Hall et al., 2009]. Šiem bērniem arī biežāk vērojamas atelektāzes krūškurvja rentgenogrammā. Biežu apnoju gadījumā var būt nepieciešama mākslīgā plaušu ventilācija arī bez citām elpošanas mazspējas izpausmēm. Nekomplicēta HRSV izraisīta slimība ir pašlimitējoša un parasti tā ilgst 1–4 nedēļas [Hall et al., 2009]. Imūnkompetentu pieaugušo elpošanas trakts pēc infekcijas no HRSV atbrīvojas jau 3–6 dienu laikā [Falsey and Walsh, 2000]. Inficēti bērni turpina izdalīt vīrusu vidēji 11 dienas [von Linstow et al., 2006]. Vīrusa izdalīšanas laiku bez vecuma nosaka arī personas imūnais stāvoklis, respektīvi, imūnsupresētas personas vīrusu izdala ilgāk, vairākus mēnešus līdz pat pusgadam [Black, 2003; Geis et al., 2013; Houspie et al., 2013]. HRSV infekcijas izraisīta sēkšana daļai pacientu ir pārejoša, savukārt citiem sēkšanas epizodes atkārtojas vai sakrīt ar astmas simptomu sākumu. HRSV loma astmas patoģenēzē ir daudz diskutēta, un šobrīd pastāv uzskats, ka smaga HRSV infekcija predisponē tās attīstību [Wennergren and Kristjánsson, 2001].

HRSV infekcijas patoģenēzē būtisks ir gan tiešs vīrusa radīts bojājums, gan organisma imūnas atbildes reakcijas. Par to liecina klīniskie pētījumi, kuros, atsevišķi lietojot antivirālus [Lagos et al., 2009; Malley et al., 1998] un pretiekaisuma [Krilov, 2011; Ferenandes et al., 2010] preparātus, tika iegūts minimāls klīniskais efekts.

1.2.4. Ārstēšana

Neskatoties uz to, ka ir veikti aptuveni 100 randomizēti kontrolēti pētījumi, akūtas virālas dziļāko elpceļu infekcijas un specifiskas HRSV infekcijas ārstēšana joprojām balstās uz vispārīgiem, atbalstošiem principiem, kur skābekļa terapija hipoksēmiskiem pacientiem, elpceļu sekrētu atsūkšana un hidratācija caur nazogastrālo zondi vai intravenozi ir terapijas stūrakmeņi. Lai arī plaši lietotas pēc „veselā saprāta” principa, skābekļa inhalāciju drošības profils un efektivitāte bērniem ar dziļāko elpceļu infekciju nekad nav izpētīti randomizētos kontrolētos pētījumos [Rojas et al., 2009]. Pašreizējās skābekļa terapijas vadlīnijas balstās uz oksihemoglobīna disociācijas līknes patofizioloģisku izpratni un tiek rekomendēta, kad arteriālo asiņu skābekļa saturācija samazinās zem 90% [American

Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006].

Bronhodilatatori bronhiolīta ārstēšanā ir salīdzinoši bieži lietoti preparāti klīniskajā praksē. Bronhodilatējošs efekts ir inhalējamiem β_2 -adrenerģiskajiem līdzekļiem, no kuriem visbiežāk tiek lietoti salbutamols un adrenalīns. Sašaurinot asinsvadus, adrenalīns var papildus samazināt arī gļotādas tūsku [Skjerven et al., 2013]. Tomēr nevienam no šiem preparātiem nav pārliecinoša efekta randomizētos kontrolētos pētījumos [Langley et al., 2005; Patel et al., 2002; Skjerven et al., 2013] un meta-analīzē [Gadomski and Brower, 2010; Hartling et al., 2011] gan ambulatoriem, gan hospitalizētiem pacientiem. Kopumā aptuveni vienam no četriem bronhiolīta pacientiem būs īslaicīgs uzlabojums no bronhodilatatoru lietošanas, bet tā klīniskā nozīmība ir neskaidra [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006]. Nesen Skjervens ar kolēģiem veica multicentru dubultaklu randomizētu kontrolētu pētījumu, kur tika salīdzinātas racēmiskā adrenalīna inhalācijas ar placebo (0,9% NaCl) inhalācijām divos dažādos režīmos – pēc pieprasījuma un pēc stingra grafika [Skjerven et al., 2013]. Adrenalīna inhalācijas nebija pārākas par placebo, savukārt inhalāciju režīmam bija būtiska nozīme. Pacienti, kas saņēma inhalācijas „pēc pieprasījuma”, tās saņēma ievērojami retāk un hospitalizācijas ilgums, kā arī nepieciešamība pēc skābekļa un mākslīgās plaušu ventilācijas, bija mazāks. Šis pētījums apliecina, ka bronhodilatatoru inhalācijas lielākajai daļai pediatrisko pacientu ir ne tikai neefektīvas, bet, nepareizi pielietotas, var radīt negatīvus efektus.

Klīniski bronhiolītam raksturīga astmai līdzīga sēkšana un tas ir saistīts ar astmas risku, turklāt imunoloģiskajiem mehānismiem ir liela nozīme tā patoģenēzē. Šie apsvērumi liek domāt, ka glikokortikoīdu terapijai varētu būt efekts simptomu mazināšanā. Tomēr 17 randomizētu kontrolētu pētījumu meta-analīze liecina, ka ne inhalējamo, ne sistēmisko glikokortikoīdu lietošanai nav ievērojama klīniskā efekta [Fernandes et al., 2010].

Sintētiskajam nukleozīdam, guanozīna analogam (1- β -D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksamīds) ribavirīnam piemīt inhibējoša aktivitāte pret vairākiem vīrusiem, t.sk. tas ievērojami samazina HRSV replikāciju *in vitro* [Black, 2003]. Mazos randomizētos pētījumos iegūtie klīniskie rezultāti ir pretrunīgi [Guerguerian et al., 1999; Smith et al., 1991] un datu meta-analīze liecina, ka, lai arī ribavirīnam ir potenciāls samazināt mākslīgās

plaušu ventilācijas un hospitalizācijas ilgumu pacientiem ar HRSV pneimoniju, pašreizējo pierādījumu līmenis neļauj dot drošas rekomendācijas [Ventre and Randolph, 2007]. Ņemot vērā sarežģīto preparāta ievadi (tas precipitē mākslīgās plaušu ventilācijas kontūrā) un lielās izmaksas, tā lietošana ir ierobežota tikai pacientiem ar smagu imūnsupresiju, piemēram, pēc hematopoētisko cilmes šūnu vai plaušu transplantācijas [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006; Chemaly et al., 2012; Zamora et al., 2011].

Antibakteriālai terapijai HRSV dziļāko elpceļu infekcijas gadījumā ir limitēta loma. Tās neuzlabo iznākumus bronhiolīta [Spurling et al., 2011] un virālas pneimonijas gadījumā [Ruuskanen et al., 2011]. Ja pacientam ir diagnosticēts akūts vidusauss iekaisums, tā ārstēšana jāveic pēc specializētajām vadlīnijām, jo klīniski nav iespējams atšķirt bakteriālu no virālas etioloģijas. Citādi bakteriālas infekcijas risks ir jāvērtē tāpat kā bērniem bez HRSV [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006]. Azitromicīnam ir pierādīts pretiekaisuma efekts un tas uzlabo arī plaušu funkcionālos rādītājus pacientiem ar *bronchiolitis obliterans* [Vos et al., 2011], tomēr randomizēti klīniskie pētījumi nav uzrādījuši efektu akūta virāla bronhiolīta gadījumā [Kneyber et al., 2008; Pinto et al., 2012].

Arī tādi līdzekļi kā krūškurvja fizioterapija [Roqué i Figuls et al., 2012], surfaktanta instilācija [Jat and Chawla, 2012], nebulizētas rekombinantas DNāzes inhalācija [Enriquez et al., 2012], leukotriēnu antagonista montelūkasta lietošana [Amirav et al., 2008] un hēlija-skābekļa gāzu maisījuma inhalācija [Chowdhury et al., 2013] ir neefektīvi, dod ļoti īslaicīgu efektu vai arī ietver nelabvēlīgu izmaksu-ieguvumu attiecību akūta bronhiolīta pacientiem.

HRSV dziļāko elpceļu lūmenā palielina ekstracelulārās adenoīna trifosfatāzes koncentrāciju, kas savukārt netieši samazina hlorīda sekrēciju un pastiprina nātrija reabsorbciju. Šīs elektrolītu izmaiņas rada elpceļu virsmas dehidratāciju un zemgļotādas tūsku un vēl vairāk nosprosto obstruktīvo elpceļu lūmenu, būtībā radot mukociliārā klīrensa mazspēju [Ater et al., 2012]. Pozitīvs klīniskais efekts šo teorētisko mehānismu novēršanā ir hipertonska NaCl inhalācijām. Četrus randomizētus kontrolētus pētījumus meta-analīze liecina, ka 3% NaCl inhalācijas samazina hospitalizācijas ilgumu un atvieglo slimības

simptomus [Zhang et al., 2008]. Šī preparāta izmaksas ir mazas, un, ņemot vērā pierādījumus, tas pagaidām ir viens no efektīvākajiem līdzekļiem.

1.2.5. Profilakse

Kopš 1998. gada ir pieejama HRSV imūnprofilakse ar pasīvu antivieli ievadi. Palivizumabs ir monoklonāla antiViela pret F proteīnu, kas tiek lietots augsta riska zīdaiņu pasīvai imūnprofilaksei. Tas ir uz peļu monoklonālas antiVielas balstīts preparāts, kas, pielietojot rekombinantās tehnoloģijas, ir „humanizēts” uz cilvēka imūnglobulīna G1 struktūras [The Impact-RSV Study Group, 1998]. Palivizumabam, piesaistoties pie konservatīvā F proteīna epitopa A (aminoskābes; aa 258–275), piemīt neitralizējoša un vīrusa-šūnas saplūšanu inhibējoša darbība [Johnson et al., 1997]. Tā lietošana pašlaik tiek rekomendēta zīdaiņiem ar hemodinamiski nozīmīgu iedzimtu sirdskaiti, priekšlaicīgi dzimuša bērna hronisku plaušu slimību un bērniem, kas dzimuši pirms 35. gestācijas nedēļas pirmajos dzīves mēnešos. Palivizumabu lieto intramuskulāri 3 līdz 5 devās ik 30 dienas, sākot no novembra līdz martam, atkarībā no lokālās HRSV sezonālītātes [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 2009]. Efektivitāte ir pierādīta divos multicentru, placebo kontrolētos, randomizētos klīniskos pētījumos, kur tā lietošana samazināja hospitalizācijas biežumu par 45 un 55%, kā arī hospitalizācijas un skābekļa terapijas ilgumu, bet neietekmēja mirstību un nepieciešamību pēc mākslīgās plaušu ventilācijas [The Impact-RSV Study Group, 1998; Feltes et al., 2003]. Šis preparāts Latvijā ir pieejams kopš 2009. gada, un tā lietošana lielā mērā balstīta uz citu Eiropas valstu pieredzi un epidemioloģiskajiem datiem. Palivizumaba galvenais trūkums ir tā lielā dārdzība, un ir skaidrs, ka HRSV infekcijas slogu būtiski ierobežot varēs tikai vakcinācija, kuras izpēte jau ilgst vairāk kā 50 gadus. Lai arī ir radīta virkne perspektīvu vakeīnu kandidātu, neviens no tiem šobrīd nav licencēts lietošanai [Anderson et al., 2013]. Vakeīnas, kas ir izgājušas I fāzes klīniskos pētījumus un kurām ir potenciāls tikt pārbaudītām II fāzē, satur galvenokārt dzīvu atenuētu vīrusu vai vīrusa subvienības (attīrīti vai ekspresēti HRSV proteīni). Paralēli ir radīti vairāki atjautīgi vakeīnu dizaini, izmantojot vīrusu vektorus, gēnu vektorus un vīrusveidīgās daļiņas, kuru pārbaude vēl kavējas I fāzes

pētījumos. Būtiski, ka vakcīnas ieviešana ir ne tikai medicīniska nepieciešamība, tā būtu arī ekonomiski izdevīga [Meijboom et al., 2012].

1.3. HRSV molekulārā epidemioloģija

1.3.1. HRSV galvenās antigēnās grupas

Pēc reakcijas ar monoklonālajām antivielām pret vairākiem HRSV proteīniem, tā celmi tiek iedalīti divās galvenajās grupās, HRSV-A un HRSV-B [Mufson et al., 1985]. Šīs grupas atbilst ģenētiski atšķirīgiem vīrusiem, kas ir evolucionējuši nošķirti jau aptuveni 350 gadus [Zlateva et al., 2005]. Epidēmiskajās sezonās abas HRSV grupas populācijā cirkulē paralēli ar mainīgu prevalenci. Parasti vērojama cikliska dominantās grupas maiņa, kur pēc vairākām secīgām HRSV-A dominantām sezonām seko viena HRSV-B dominanta sezona [Venter et al., 2001; Zlateva et al., 2007].

1.3.2. HRSV genotipi

Ievērojama HRSV mainība ir vērojama arī grupu ietvaros, un abās grupās cirkulējošie celmi tiek iedalīti vairākos genotipos. Vienlaicīgi sabiedrībā var cirkulēt dažādi genotipi, kurus sekojošās sezonās var nomainīt jauni, savukārt, iepriekš izplatīti genotipi izzust [Peret et al., 2000; Venter et al., 2001; Zlateva et al., 2007]. Vislielākās atšķirības gan starp abām grupām, gan grupu ietvaros ir atrodamas gēnā, kas kodē G proteīnu. Starp grupām G gēna identitāte ir 67% nukleotīdu (nt) līmenī un 53% aa līmenī [Johnson et al., 1987]. Genotipu klasifikācija, kas veidota, balstoties uz šī gēna nepilnu sekvenēšanu, pēdējos 15 gadus tiek plaši izmantota HRSV molekulārās epidemioloģijas pētījumos. 1998. gadā Perē ar kolēģiem definēja HRSV genotipus pēc Ziemeļamerikas izolātu filoģenētisko koku topoloģijas, kas tika veidoti uz īsu (270 nt) 3' G gēna fragmentu pamata. Sākotnēji tika izdalīti pieci HRSV-A genotipi (GA1–5), starp kuriem atšķirības bija 10–28% aa līmenī, un četri HRSV-B genotipi (GB1–4), starp kuriem bija 7–19% aa atšķirības [Peret et

al., 1998; Peret et al., 2000]. Gadu gaitā šī klasifikācija ir papildināta un šobrīd ir zināmi vismaz 11 HRSV-A genotipi: GA1–7 [Peret et al., 2000], SAA1 (Dienvidāfrika³, A1) [Venter et al., 2001], kā arī nesenāki NA1 un 2 (Niigata⁴, 1 un 2) [Shobugawa et al., 2009] un ON1 (Ontario⁵, 1) [Eshaghi et al., 2012]. Savukārt HRSV B grupā izšķir vismaz 13 genotipus: GB1–4 (Peret et al., 1998), SAB1–3 [Venter et al., 2001] un BA-I–VI (Buenosaires, I–VI) [Trento et al., 2006]. Pastāv arī zināmas atšķirības lietotajā nomenklatūrā dažādās laboratorijās. Tā piemēram, Keina ar kolēģiem ir izveidojusi HRSV-A nomenklatūru, kur Birmingemas (Lielbritānijā) izolātu genotipi tiek numurēti A1–5 [Cane, 2001], un, lai arī šīs ģenētiskās līnijas atbilst Perē klasifikācijai, numerācija ir cita (piemēram, A5 atbilst GA1). Zlateva ar kolēģiem HRSV-B izolātiem no Beļģijas, kas atbilst BA ģenētiskajām līnijām, lieto nosaukumu GB13 [Zlateva et al., 2005]. Vairāku citu strukturālo gēnu (N, F, SH), nekodējošo sekvenču un pilna genoma filoģenētiskā analīze ir apstiprinājusi, ka mainība G gēnā atspoguļo vispārējo vīrusa variabilitāti [Eshaghi et al., 2012; Gaunt et al., 2010; Rebuffo-Scheer et al., 2011; Sullender et al., 2000; Tan et al., 2012]. Jaunus genotipus pieņemts izdalīt, kad tie izpilda Venteres un kolēģu ieteiktos kritērijus: (i) sākumpalaišanas⁶ vērtība tā zaram filoģenētiskajā kokā ir $\geq 70\%$ un (ii) ģenētiskā distance starp tā izolātiem ir $\leq 0,07$ [Venter et al., 2001].

HRSV lielā mainība daļēji izskaidro biežo reinfekciju skaitu visa cilvēka mūža laikā [Sullender, 2000]. Neitralizējošo antivielu atbilde ir grupu specifiska [Sande et al., 2013], un tā izzūd aptuveni 7–9 mēnešu laikā pēc infekcijas, bet celmu specifiskā imunitāte – aptuveni 2–4 mēnešu laikā [Scott et al., 2006; Yamaguchi et al., 2011]. Viens un tas pats indivīds var atkārtoti slimot arī ar viena un tā paša genotipa izraisītām infekcijām [Houspie et al., 2013].

Dažādu genotipu klīniskās atšķirības varētu būt būtisks aspekts vakcīnas celmu izvēlē un individuālā pacienta prognozē. Daļā pētījumu ir konstatēta noteikta genotipa asociācija ar smagāku slimības gaitu [Hall et al., 1990; Hornsleth et al., 1998; Imaz et al., 2000; Martinello et al., 2002; Walsh et al., 1997], kamēr citos tāda nav atrasta [Kneyber et al., 1996; McIntosh et al., 1993; Wang et al., 1995].

³ South Africa.

⁴ Japānā.

⁵ Kanādā.

⁶ Bootstrap.

1.3.3. HRSV virsmas glikoproteīns G

G ir II tipa transmembrālais glikoproteīns, kas ir 298 aa garš (references celmam A2). Ar HRSV inficētās šūnās tas tiek producēts divās formās – ar membrānu saistītā formā un šķīstošā formā, kas tiek sekretēta apkārtējā vidē un kura translācija tiek iniciēta ar alternatīvu iekšēju starta AUG kodonu [Roberts et al., 1994]. Virzienā no N- uz C-galu pilna garuma proteīnam izšķir trīs strukturālos domēnus: citoplazmatisko (aa 1–37), transmembrāno (aa 38–63) un lielu ektodomēnu (sākot no aa 64). Ektodomēns sastāv no diviem mucīnam līdzīgiem hipervariabliem reģioniem (HVR1 un 2), kurus savā starpā atdala 13 pilnībā konservatīvu aa segments (references celma A2 aa pozīcijas 164–176), kas ir nemainīgs abās HRSV grupās [Johnson et al., 1987] (1.2. attēls).

1.2. att. HRSV G proteīna strukturālie un antigēnie domēni

Atainota pilna garuma G proteīna shēma. NH₂ un COOH attiecīgi norāda N- un C-galus. Zils taisnstūris norāda hidrofobo transmembrāno domēnu (aa 38 – 63). HVR1 un 2 ir mucīnam līdzīgie hipervariālie reģioni. Ar (C) apzīmēti cisteīnu atlikumi, centrālajā konservatīvajā rajonā četru cisteīnu sakopojums trīsdimensiju struktūrā veido divus disulfīda tiltiņus, t.s. cisteīnu cilpu, kas, iespējams, ir receptoru piesaistes vieta [Feldman et al., 1999]. Norādīta konservatīvo, grupu un celmu specifisko epitopu lokalizācija. Ar cipariem norādītas aminoskābju pozīcijas. Apakšējā panelī atainota homodimēra trīsdimensionālās struktūras shēma. Attēls veidots pēc [Cane, 2001] un [Melero, 2007].

Sekvenču dažādība HVR segmentos ir viena no lielākajām, kāda novērota starp cilvēka vīrusiem, un ietver tādas nozīmīgas izmaiņas kā aa substitūcijas, delēcijas, insercijas, mutācijas ar rāmja nobīdi, lielas duplikācijas un priekšlaicīgus terminācijas kodonus. Šīs mutācijas atspoguļo gan saimnieka organisma imūnās sistēmas radītu selekciju, gan apbrīnojamu proteīna strukturālo plasticitāti [Collins and Melero, 2011; Houspie et al., 2013; Trento et al., 2003; Zlateva et al., 2005]. Plašo mutāciju spektra rezultātā G proteīna garums var variēt no 215 līdz 321 aa [Eshaghi et al., 2012; Houspie et al., 2013]. Arī mutanti ar gandrīz pilnu G gēna delēciju ir izdalīti no imūnsupresētiem

pacientiem [Venter et al., 2011]. Šādi vīrusi saglabā spēju replicēties *in vitro* un *in vivo*, bet ir pārāk atenuēti, lai replicētos vai izraisītu imūno atbildi imūnkompetentiem bērniem [Karron et al., 1997]. HVR segmenti satur vairākus celmu specifiskus epitopus, kuri ir lokalizēti, izmantojot peļu monoklonālās antivielas un cilvēku rekonvalescences fāzes serumus [Cane, 2001]. Mucīnam līdzīgie reģioni, tāpat kā eikariotiskie mucīni, ir bagāti ar serīna, treonīna un prolīna atlikumiem un ir izteikti glikozilēti ar O- un N-saites veidojošu ogļhidrātu ķēdēm. Glikozilācijas pozīciju skaits un vieta nav konservatīvi starp dažādiem celmiem, un to mainība pastiprina antigēnās atšķirības [Johnson et al., 1987; Martinez et al., 1997; Palomo et al., 1991].

1.4. Evolūcijas analīzes metodes

RNS vīrusu filoģenētiskie pētījumi ir ērti pielietojami, jo to genomu raksturīgas biežas mutācijas un nozīmīgas izmaiņas var tikt noteiktas vai atbilstoši aprēķinātas, izmantojot sekvenču, kas iegūtas no salīdzinoši īsā laikā savāktiem klīniskajiem paraugiem. Filoģenētiskā analīze sākas ar nukleīnskābju sekvenču iegūšanu un atbilstošu izkārtotāšanu, kas nozīmē, ka dažādas sekvenču rindas tiek izvietotas viena virs otras tā, lai atbilstīgi tās veidotu vertikālu kolonnu. Atšķirīgām sekvenču rindām var atšķirties ne tikai nt (resp., substitūcijas), bet arī sastopamas insercijas vai delēcijas; šādos gadījumos, lai saglabātu izkārtotāšanu, ir nepieciešams ieviest spraugas. Bioinformātikas datorprogrammās tiek lietoti dažādi sekvenču izkārtotāšanas algoritmi, kas atšķiras ar „sodu”, ko tās piešķir par spraugu ieviešanu. Populārākās brīvi pieejamās izkārtotāšanas datorprogrammas ir BioEdit [Hall, 1999] un ClustalW2 [Larkin et al., 2007]. Nākamais solis filoģenētiskajā analīzē ir filoģenētiskā koka konstruēšana, kas ir efektīvs veids, kā vizualizēt sekvenču ģealoģiju. Kā ciltskokam tam ir sakne un zari, kas atiet no mezgliem, un to galos atrodas individuālie taksoni. Katrs mezgls atbilst kopīgam ciltstēvam (MRCA⁷) un zari ap tiem var brīvi rotēt, nezaudējot interpretācijas nozīmi. Tas, cik tuva radniecība pastāv starp taksoniem vai zariem, parasti ir atainots horizontālajā asī (visbiežāk šī ass atbilst nt substitūciju skaitam pozīcijā). Attālumiem vertikālajā asī nav evolucionāras nozīmes un tie var tikt mainīti, lai

⁷ Most recent common ancestor.

padarītu koku uzskatāmāku. Filoģenētisko koku var attēlot arī uz laika ass, ja ir zināms nt substitūciju ātrums pozīcijā, t.i. sekvences atbilst „molekulārajam pulkstenim”. Vienkāršākais molekulārā pulksteņa modelis ir pieņēmums, ka nt substitūcijas ātrums ir konstants laikā starp dažādām ģenētiskajām līnijām. Tomēr bieži datu kopas labāk raksturo mazāk stingra jeb atslābināta molekulārā pulksteņa pieņēmums [skat. Lam et al., 2010 un atsaucies šajā publikācijā].

Pastāv divi galvenie veidi, kā noteikt evolucionārās attiecības starp dažādām sekvencēm: distanču un diskretās (uz īpašību balstītas) metodes. Lietojot pirmo no tām, vispirms tiek aprēķinātas ģenētiskās distances starp sekvencēm (t.i. tiek izveidota distanču matrica) un pēc tam, izmantojot šīs distances, tiek konstruēts filoģenētiskais koks. *Neighbor-joining* (NJ) ir visbiežāk lietotā distanču metode. Tās pamatā ir filoģenētiskā koka konstruēšana, klasterējot ģenētiski vistuvāko sekvenču pārus („kaimiņus”) [Saitou and Nei, 1987]. NJ galvenā priekšrocība ir tās aprēķināšanas ātrums un tā neprasa lielus informāciju tehnoloģiju resursus. Pretstatā distanču metodēm, diskretās metodes izmanto pašas sekvences (nevis to ģenētiskās distances). Maksimālās patīkamības (ML⁸) un Baijesa rekonstrukcijas metodes ir visbiežāk lietotās diskretās metodes. Tā kā šīs metodes pārbauda praktiski visus iespējamus kokus, tās ir lēnas un prasa lielus informāciju tehnoloģiju resursus.

Infekcijas slimību izplatībā svarīgi ir gan ģenētiskie, gan ekoloģiskie faktori. Notiekot vīrusu transmisijai starp indivīdiem, notiek arī to pārvietošanās telpā, kur šie vīrusi tiek pakļauti dažādu ekoloģisko faktoru spiedienam. Tā rezultātā ģeogrāfiskā lokalizācija var atstāt izmērāmu ietekmi paraugu gēnu sekvencēs (t.s. ģeogrāfiski strukturēti gēnu signāli). Pat vienas epidēmijas laiks ātri evolucionējošiem RNS vīrusiem ir pietiekošs, lai tie uzkrātu informatīvas mutācijas [Castro-Nallar et al., 2012; Holmes, 2008]. Tādējādi vīrusu sugu ietvaros gēnu ģeoloģiju var izmantot, lai rekonstruētu demogrāfiskās un ģeogrāfiskās izkļedes parametrus. Baijesa filoģenētiskā rekonstrukcija izmanto Baijesa teorēmu, kur, ņemot vērā sākotnējo filoģenēzes varbūtību un nosacījuma varbūtības (patīkamības) parametrus tiek aprēķināta aposteriorā (jeb kopējā) koka varbūtība. Šim nolūkam tiek izmantots Markova ķēdes Montekarlo algoritms: nejauši tiek izraudzīts sākotnējais koks, uz kura bāzes tiek ģenerēts jauns koks, izmantojot modeļa parametrus.

⁸ Maximum likelihood.

Jaunais koks tiek pieņemts vai noraidīts, izmantojot speciālu iztveršanas⁹ procedūru. Ja jaunais koks tiek pieņemts, tas tiek modificēts tālāk, līdz to atkal nomaina cits koks. Šī ķēde tiek turpināta līdz analīzes rezultāti sasniedz stacionāru sadalījumu (bieži $>1 \times 10^6$ reižu). Lietojot Baijesa rekonstrukcijas metodes, atšķirībā no citām filoģenētisko aprēķinu metodēm, pietiek zināt tikai nepieciešamo parametru varbūtības sadali [Lemey et al., 2009]; tās ļauj veikt ciltstēvu rekonstrukciju (saplūšanu¹⁰), vienlaicīgi ņemot vērā to filoģenētisko un ģeogrāfisko nenoteiktību. Pēdējos gados, attīstoties gan sekvenēšanas tehnoloģijām, gan informācijas apstrādes ātrumam, ir radītas vairākas datorprogrammas, kas izmanto šādas varbūtības metodes, piemēram, BEAST, BAMBE un MrBayes.

Vēl viens būtisks vīrusu evolūcijas aspekts ir tās virziens. Mutācijas, kas rodas individuālā vīrusa genomā, stabilizāciju vīrusa populācijas mērogā nosaka dabīgā atlase, kas var būt gan pozitīva (jeb adaptīva, t.i. priekšrocīgu mutāciju atlasošā), gan negatīva (jeb attīroša, t.i. nevēlamu mutāciju iznīcinoša), bet, ja tās trūkst – neitrāla selekcija (konkrētā gēna evolūciju nosaka vienīgi ģenētiskais drifts). Nukleotīdu mutācijas proteīnu kodējošās genoma daļā var iedalīt kā sinonīmas (dS) un ne-sinonīmas (dN). Termins sinonīma mutācija nozīmē, ka kodējošās sekvences nt nomaiņas rezultātā nemainās aa sekvence. Turpretim, ne-sinonīma nt mutācija rada aa nomaiņu un tādējādi, mainot proteīna funkciju, atrodas zem selekcijas spiediena. Ja attiecīgais kodējošais reģions atrodas zem pozitīva selekcijas spiediena, ne-sinonīmās (dN) substitūcijas būs biežāk kā sinonīmās (dS), t.i. $dN/dS > 1$. Tā saucamās skaitīšanas un ML metodes tiek bieži izmantotas vīrusu evolūcijas pētījumos, lai noteiktu dN/dS attiecību sekvenču datu kopā. Skaitīšanas metodes statistiski salīdzina iespējamo sinonīmo un ne-sinonīmo pozīciju skaitu ar reāli novērotajām substitūcijām sekvenču izkārtojumā. ML metodes piemēro kodonu substitūcijas modeli sekvenču datu kopai un aprēķina modeļa parametrus, maksimizējot nosacījuma varbūtības funkciju. Šie aprēķini ir sarežģīti un ir daudz lēnāki par skaitīšanas metodēm; izmantojot personālo datoru, tie nereti aizņem dienas vai pat nedēļas, tādēļ praktiski ir izmantot internetā pieejamus datoru klasteru servisos kā, piemēram, Datamonkey serveri (<http://www.datamonkey.org/>) [Delport et al., 2010]. Šajā interneta serverī ir pieejami vairāki skaitīšanas un ML algoritmi, no kuriem RNS vīrusu kodējošo sekvenču dabīgās

⁹ Sampling.

¹⁰ Coalescent theory.

atlases analīzē bieži lietoti ir SLAC¹¹, FEL¹², REL¹³, IFEL¹⁴ un MEME¹⁵. Pirmās trīs no šīm metodēm ir dažādas ML metodes, kas ļauj noteikt dN/dS attiecību katrā kodonā filoģenētiskā koka ārējos zaros. SLAC metode skaita dN un dS izmaiņas un pārbauda, vai dN nozīmīgi atšķiras no dS . Algoritms apstrādā sekvenču izkārtojumu, izmantojot filoģenētiskā koka zaru garumus, nt un kodonu substitūciju parametrus un senču sekvenču rekonstrukciju. FEL ir salīdzinoši jaunāka un statistiski precīzāka metode, kas atbilstoši kodonu substitūcijas modelim katrā pozīcijā neatkarīgi veic varbūtību attiecības testu, lai izvērtētu, vai modelis, kas pieņem $dN=dS$, var tikt atmests par labu modelim, kas pieņem $dN \neq dS$. REL metode piemēro kodonu substitūcijas modeli visam sekvenču izkārtojumam, bet pieļauj dN/dS attiecības variācijas starp pozīcijām. Salīdzinot ar REL, FEL metode retāk dod viltus pozitīvus rezultātus, kad tiek izmantotas mazas datu kopas [Kosakovsky Pond and Frost, 2005]. IFEL ir ML metode, kas ļauj noteikt, vai sekvences, kas iegūtas no kādas populācijas daļas (piemēram, HRSV sekvences no dažādiem pacientiem), ir pakļautas atlases spiedienam populācijas līmenī (starp filoģenētiskā koka iekšējiem zariem) [Kosakovsky Pond et al., 2006]. MEME ļauj izvērtēt gan paliekošas, gan epizodiskas pozitīvās selekcijas spiedienu. Šī metode mazina pieņēmumu, ka selekcijas spēks un virziens ir konstants, pieļaujot dN/dS variācijas starp pozīcijām, kā arī vienā pozīcijā dažādos filoģenētiskā koka zaros [Murrell et al., 2012].

HRSV filodinamiskie aprēķini, balstoties uz HVR2 sekvenču ģealoģiju, iepriekš ir labi sakrituši ar novērotajiem epidemioloģiskajiem rezultātiem – salīdzinoši precīzi noteikuši vīrusa ģenētisko līniju izcelšanās laiku, un aprēķinātais vīrusa populācijas izmērs ir bijis proporcionāls prevalences datiem [Houspie et al., 2013; Katzov-Eckert et al., 2013; Trento et al., 2010]. Piemēram, 1999. gadā tika konstatēts pirmais HRSV-B izolāts ar 60 nt duplikāciju G gēnā [Trento et al., 2003]. Vīrusi ar šo mutāciju strauji izplatījās pa visu pasauli, tomēr vajadzēja pāiet aptuveni 7 gadiem, lai tas aizstātu visas iepriekšējās HRSV-B līnijas. Šis laiks sakrīt ar BA-IV celma populācijas strauju pieaugumu, un šobrīd tas ir gandrīz 100% gadījumu izolētais HRSV-B genotips [Trento et al., 2010]. Jaunu patogenitātes faktoru izplatīšanās prognozēšana varētu ļaut laicīgi plānot sabiedrības

¹¹ Single likelihood ancestor counting.

¹² Fixed effects likelihood.

¹³ Random effects likelihood.

¹⁴ Internal fixed effects likelihood.

¹⁵ Mixed effects model of evolution.

veselības stratēģijas, lai ierobežotu epidēmijas izplatību vai novērstu to. HRSV genotipi ļoti ātri izplatās plašos ģeogrāfiskos reģionos, un to celmi ir vairāk radniecīgi laikā (temporāli) nekā telpā (ģeogrāfiski) [Peret et al., 2000; Trento et al., 2010], kas apgrūtina to analīzi [Katzov-Eckert et al., 2013], tomēr pastāv arī lokalizēti klasteri, kas ļauj rekonstruēt to filoģeogrāfiju [Root et al., 2012].

2. METODES

2.1. tabula

Pētījumā izmantotās aparātūras un materiālu saraksts

Darba etaps	Aparātūra	Materiāli/reāģenti/datorprogrammas
Visiem darba etapiem	Kelvinators (Revco, -70°C); centrifūga (Beckman Microfuge 11; Eppendorf 5415R)	Mikropipetes (Eppendorf Research); vienreizlietojamais materiāls: sterilas mikromēģenes, pipešu uzgaļi
Klīnisko datu vākšana	Pulsoksimetrs (Masimo SET)	Datorprogramma WHO Anthro v3.2.2
NFA iegūšana	Aspirācijas sūknis (Vaccuson 18, Neuvag)	Sterila, vienreizlietojama gļotu savākšanas sistēma (B Braun Trachea-secretion test set)
RNS izolēšana		QIAamp Viral RNA (QIAGEN)
RT-PCR	Biociklizators (TC-S, Biosan)	RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase, Taq DNA Polymerase, RiboLock™ RNase Inhibitor, dNTP mix (Fermentas); amplifikācijas praimeru (Metabion)
Paraugu elektroforēze agarozes gēlā	Strāvas avots (Consort E143); ultravioletā starojuma avots un gēlu dokumentēšanas iekārta (UVP C-80 Epi-Illumination UV Darkroom)	GeneJET™ Gel Extraction reāģentu kits, TopVision LE GQ agarozes, GeneRuler 1 kDa DNA ladder (Fermentas); etīdija bromīds, datorprogramma paraugu vizualizēšanai UVP Grab-IT
Klīnisko datu statistiskā apstrāde		Datorprogrammas: Microsoft Excel 2010 un SPSS 17.0
Sekvenēšana	Automātiskā DNS sekvenēšanas sistēma (ABI PRISM, Applied Biosystems)	BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), sekvenēšanas praimeru (Metabion), molekulāro datu apstrādes datorprogramma Vector NTI Advance 10 (Invitrogen)
Bioinformātika		Datorprogrammas: Clustal W2 Multiple Sequence Alignment tool, MEGA v5.1, DNAsp v5, DAMBE v5.3.32, NetOGlyc v3.1 un NetNGlyc v1.0 serveri, Datamonkey serveris, Path-O-Gen v1.4, BEAST v2.0.2, SPREAD v1.0.6
Datu vizualizācija		Datorprogrammas: ESRI ArcMap 10.1, CorelDRAW x6

2.1. Pētījuma populācija

Šis prospektīvais kohortas pētījums tika veikts Valsts sabiedrībā ar ierobežotu atbildību „Bērnu klīniskā universitātes slimnīca” Torņakalna novietnē (BKUS) laika posmā no 2009. gada 1. jūlija līdz 2012. gada 30. jūnijam. Pētījums saņēma Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju, un informētu piekrišanu dalībai tajā parakstīja visu iekļauto pacientu vecāki (skat. 1. pielikumu). Par iekļaušanas kritērijiem kalpoja: (1) bērna vecums, 2–24 mēneši, un (2) atbilstība PVO dziļāko elpceļu infekcijas gadījuma definīcijai (2.1. attēls) [Wright and Cutts, 2000]. Lai izvairītos no iespējamiem jaucējfaktoriem, par izslēgšanas kritērijiem tika noteikti: (1) hroniskas pavadošas centrālās nervu sistēmas un kardiopulmonālas slimības un (2) pacienti, kuru simptomi bija ilgāki par 10 dienām.

2–11 mēn.	12–24 mēn.
Ātra elpošana, ≥ 50 reižu minūtē	Ātra elpošana, ≥ 40 reižu minūtē
VAI	
Krūškurvja retrakcijas	
VAI	
Stridors mierīgam bērnam	
VAI	
Sēkšana	
VAI	
Apnoja	

2.1. att. PVO dziļāko elpceļu infekcijas klīniskā diagnostikas shēma

Pacientu sūdzības, antropometriskie rādītāji, anamnēzes dati, objektīvā izmeklēšana, pulsoksimetra rādītāji, laboratorā atrade, radioloģiskās izmaiņas, saņemtā terapija un hospitalizācijas ilgums tika atzīmēti standartizētā protokolā. Lai salīdzinātu dažādu vecumu bērnu antropometriskos rādītājus, tie tika standartizēti ar vecumam atbilstošām z-vērtībām, izmantojot datorprogrammu WHO Anthro v3.2.2 (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>). Klīniskie dati tika objektivizēti, izmantojot punktu skalas. Respiratorā distresa novērtēšanas instruments (RDNI) gradē elpošanas mazspēju no 0–17 un tiek plaši izmantots klīniskajos pētījumos (2.2. tabula) [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis,

2006; Lowell et al., 1987]. Adaptēta Klīniskā smaguma skala (KSS) novērtēja slimības smagumu no 0 līdz 6 punktiem: mākslīgā plaušu ventilācija – 2 punkti; stacionēšana, hospitalizācija ≥ 5 dienām, arteriālā skābekļa saturācija $\leq 87\%$, skābekļa terapija – katrs pa vienu punktu [Martinello et al., 2002]. Tika vērtēta pacientu atbilstība sistēmiskā iekaisuma atbildes sindroma (SIRS) kritērijiem [Goldstein et al., 2005].

2.2. tabula

Respiratorā distresa novērtēšanas instruments [Lowell et al., 1987]

	Punkti					Maks.
	0	1	2	3	4	
Sēkšana						
Ekspiratora	Nav	Beigās	½	¾	Pilna	4
Inspiratora	Nav	Daļēja	Pilna			2
Lokalizācija	Nav	Segmentāra ^a	Difūza ^b			2
Retrakcijas						
Supraklavikulāras	Nav	Viegla	Vidēja	Ievērojama		3
Interkostālas	Nav	Viegla	Vidēja	Ievērojama		3
Subkostālas	Nav	Viegla	Vidēja	Ievērojama		3
Kopā:						17

^a ≤ 2 no 4 plaušu laukiem

^b ≥ 3 no 4 plaušu laukiem

2.2. Klīniskie paraugi

No katra pētījumā iekļautā pacienta tika iegūts nazofaringeālais aspirāts (NFA). Caur deguna eju aizdegunē (dziļumā atbilstoši attālumam no deguna atveres līdz auss *tragus*) tika ievadīts sterils 8 Fr atsūkšanas katetrs. Aspirāts tika savākts ar *Trachea-secretion test set* sistēmu (B. Braun Melsungen AG), pielietojot 100–200 mBar negatīva spiediena katetra izvilkšanas laikā (~ 10 s). Lai nepazaudētu katetrā atlikušo materiālu, tas tika izskalots ar 2 ml 0,9% NaCl šķīduma. NFA paraugi tika nekavējoties iesaldēti un uzglabāti pie -70°C līdz turpmākai analīzei.

Kopējā RNS tika izolēta no 140 μl NFA parauga, izmantojot komerciālu RNS izolēšanas kitu (QIAamp Viral RNA, QIAGEN) saskaņā ar ražotāja rekomendācijām.

Izdalītā RNS tika izšķīdināta 60 µl AVE buferšķīdumā (QIAGEN) un atkal iesaldēta pie -70°C. Izdalītā RNS kalpoja par matricu HRSV molekulārās diagnostikas testu izstrādei.

Daļai pacientu tika ņemta arī rutīnas deguna iztriepe (ārpus pētījuma protokola pēc ārstējošā ārsta ieskatiem). Deguna iztriepē tika noteikta HRSV, adenovīrusa, gripas vīrusu A un B, paragripas vīrusu 1–3 un cilvēka metapneimovīrusa antigēnu klātbūtne ar kvalitatīvu netiešo imūnfluorescences testu (IFA) SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” stacionāra „Latvijas Infektoloģijas centrs” (LIC) laboratorijā (IMAGEN™ Respiratory screen kit, Oxoid). Pētījuma laikā tā bija standartmetode respiratoro vīrusu diagnostikai BKUS.

2.3. HRSV diagnostika, grupu diferencēšana, sekvenčšana

2.3.1. cDNS sintēze

HRSV specifiskā cDNS tika sintezēta ar RT-PCR, izmantojot RevertAid™ Premium apgriezto transkriptāzi (Fermentas) ar 12,5 µL izdalītās RNS un 20 pmol praimeru F164_Rv (skat. 2.3. tabulu). cDNS sintēze notika 30 min 50°C, reakcija tika pārtraukta, karsējot 5 min 85°C.

Oligonukleotīdu* praimeru HRSV molekulārajai analīzei

Praimeris un mērķis	Gēns	Pozīcija	Sekvence (5'→3')	Atsauce
cDNA sintēze				
F164_Rv	F	173–151 ^a	GTTATRACACTRGTATACCAACC	[Sullender et al., 1993]
HRSV diagnostika				
P_Fw	P	452–475 ^a	CATTAGTAGTTGCAAGTGCAGGAC	Šis pētījums
M_Rv	M	46–25 ^a	CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTG	Šis pētījums
Grupu diferencēšana				
Ga_Fw	G	522–542 ^a	CATATGCAGCAACAATCCAAC	Šis pētījums
Gb_Fw	G	328–347 ^b	CCAATCCACACAAATTCAGC	Šis pētījums
F_Rv	F	6–(-15) ^a	CTCCATTGTTATTTGCCCCAG	[Peret et al., 1998]
A grupas G gēna 5' gala amplifikācija				
RSVa_preG3_Fw	G	(-59)–(-36) ^a	TAGTCATAACAATGAACTAGGAT	Šis pētījums
RsGa_Rv	G	548–527 ^a	CAGCAGGTTGGATTGTTGCTG	Šis pētījums
B grupas G gēna 5' gala amplifikācija				
RSVb_preG_Fw	G	(-95)–(-74) ^b	CAACTATCATGGTAGCATAGAG	Šis pētījums
RsGb_Rv	G	533–514 ^b	GTTGCCACATATACTACAGG	Šis pētījums

* Visi oligonukleotīdi, kas izmantoti šajā pētījumā, tika sintezēti Metabion

Nukleotīdu pozīcijas norādītas balstoties uz numerāciju HRSV prototipu celmos:

^a A2 (GenBank pieejas kods M74568) [Wertz et al., 1985]

^b B1 (GenBank pieejas kods AF013254) [Karron et al., 1997]

2.3.2. HRSV diagnostika un grupu diferencēšana

Pirmkārt, HRSV specifiskās RNS klātbūtne tika detektēta ar PCR, amplificējot ģenētiski konservatīvu genoma rajonu starp P un M gēniem, neatkarīgi no vīrusa antigēnās grupas (2.3. tabula, 3.1. attēls). Tālāk pozitīvajiem paraugiem tika noteikta piederība galvenajām grupām, HRSV-A un B, veicot grupu specifisku PCR G gēna HVR2 segmentam. Apgrieztais praimeris F_Rv bija kopīgs abām grupām, bet tiešie praimeru bija grupu specifiski: Ga_Fw A grupai un Gb_Fw B grupai (2.3. tabula). PCR tika veikta TC-S biociklizatorā (Thermal Cycler, BioSan) ar Taq DNS polimerāzi (Fermentas) 2 min pie

94°C, kam sekoja 40 cikli ar denaturāciju 30 s pie 94°C, salipšanu 30 s pie 55°C un amplifikāciju 1 min pie 72°C. Amplificētie fragmenti tika analizēti elektroforētiski ar etīdija bromīdu krāsotā 1% agarozes gēlā.

2.3.3. DNS sekvenēšana

Grupu diferencēšanas PCR produkti tika izdalīti no agarozes gēla ar GeneJET™ ekstrakcijas kitu (Fermentas). Attīrītie DNS fragmenti tika sekvenēti, izmantojot apgriezto praimeru F_Rv un tiešos praimerus Ga_Fw (HRSV-A) un Gb_Fw (HRSV-B), ABI PRISM 3130x1 ģenētiskajā analizatorā (Applied Biosystems) ar BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Šādā veidā pēc datu apstrādes tika iegūtas 336 nt garas HRSV-A (kodonu pozīcijas 187–299 atbilstoši references celma A2 sekvencai) un 516 nt garas HRSV-B (kodonu pozīcijas 140–293 atbilstoši references celma B1 sekvencai) sekvences. 2010./2011. un 2011./2012. sezonu unikālās sekvences tika reģistrētas GenBank datu bāzē ar pieejas kodiem no KF030137 līdz KF030185. Papildus tam 2009./2010. sezonas izolātiem tika amplificēts arī G gēna 5' gals, izmantojot RSVa_preG3_Fw un RsGa_Rv vai RSVb_preG_Fw un RsGb_Rv praimerus attiecīgi A un B grupai (2.3. tabula). Šie fragmenti tāpat kā iepriekš tika izdalīti no agarozes gēla un sekvenēti, izmantojot tiešos praimerus RSVa_preG3_Fw un RSVb_preG_Fw atbilstoši grupai. Tādējādi tika iegūtas pilnas G gēna sekvences, kas tika reģistrētas GenBank datu bāzē ar pieejas kodiem no JF979145 līdz JF979157.

2.4. Filoģenēzes un adaptīvās evolūcijas analīze

2.4.1. Filoģenētiskā analīze

Pētījumā iegūtās HRSV nt un deducēto aa (lietojot universālo ģenētisko kodu) sekvences tika izkārtotas kopā ar iepriekš publicētām sekvencēm, kas pieejamas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Sekvenču izkārtošana tika veikta ar EMBL-EBI

ClustalW2 Multiple Sequence Alignment rīku [Larkin et al., 2007]. Identiskās nt un aa sekvences tika identificētas, lietojot datorprogrammu DAMBE16 v5.3.32 (<http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp>). Filoģenētiskie koki tika konstruēti ar NJ algoritmu [Saitou and Nei, 1987], un ģenētiskās distances (vidējais nt un aa substitūciju skaits katrā novietojumā starp visiem sekvenču pāriem) tika aprēķinātas, izmantojot piemērotāko substitūcijas modeli datorprogrammā MEGA v5.1¹⁷ [Tamura et al., 2001]. Aprēķinu statistiskā nozīmība tika pārbaudīta ar sākumpalaišanas protokolu, izmantojot 1000 kopijas. Nukleotīdu polimorfisms (vidējais nt nomaiņu skaits novietojumā; π) tika aprēķināts, izmantojot datorprogrammu DNAsp v5¹⁸ [Librado and Rozas, 2009].

2.4.2. Glikozilācijas vietu prognozēšana

O-glikozilācijas pozīcijas tika noteiktas, izmantojot NetOGlyc 3.1 servera neirālā tīkla prognozes (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), un G vērtība $>0,5$ tika izmantota kā sliekšņa vērtība [Julenius et al., 2005]. Konsensa motīva asparagīns-X-serīns/treonīns (N-X-S/T), kur X ir jebkura aminoskābe, izņemot prolīnu [Hart, 1992], N-glikozilācija tika prognozēta, kad NetNGlyc 1.0 servera (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) glikozilācijas potenciāls bija $>0,5$ [Gupta et al., 2004].

2.4.3. Dabīgā atlase

Kodoni, kuri atrodas zem pozitīvās selekcijas spiediena, tika noteikti ar katrai pozīcijai specifisku dN/dS attiecību, izmantojot piecus dažādus algoritmus, kas pieejami Datamonkey serverī (<http://www.datamonkey.org/>) [Delpont et al., 2010]: SLAC, FEL, REL, IFEL un MEME. Piemērotākais substitūcijas modelis tika izvēlēts, izmantojot datorprogrammu MEGA v5.1. Tika pieņemts, ka kodons atrodas zem pozitīvas selekcijas

¹⁶ Data Analysis in Molecular Biology and Evolution.

¹⁷ Molecular Evolutionary Genetics Analysis.

¹⁸ DNA Sequence Polymorphism.

selekcijas spiediena, kad divas vai vairāk metodes tā pozīcijā aprēķināja $dN/dS > 1$ ar statistisku nozīmību ($p < 0,1$ vai Baijesa faktors > 20) kā to rekomendē [Kosakovsky Pond et al., 2005]. Vidējā dN/dS attiecība tika noteikta, izmantojot SLAC algoritmu. Analogi gēnu fragmenti (t.i. referenču celmu A2 un B1 kodonu pozīcijas no 187 līdz Stop) tika lietoti visos gadījumos, kad abas HRSV grupas tika savstarpēji salīdzinātas.

2.5. Evolūcijas ātrums, populācijas dinamika un filoģeogrāfiskā analīze

Lai pārbaudītu, vai nt sekvenču dati uzrāda novirzi laikā (t.i. pārbaudīt molekulārā pulksteņa hipotēzi), tika veikta ģenētisko distanču novirzes lineārās regresijas analīze kā izolēšanas laika funkcija, izmantojot datorprogrammu Path-O-Gen v1.4 [Drummond et al., 2003]. Ģenētiskās distances tika iegūtas, konstruējot ML filoģenētisko koku ar datu kopai vislabāk atbilstošo nt substitūcijas modeli datorprogrammā MEGA v5.1. Iegūto datu statistiskā pārbaude un vizualizācija tika veikta, izmantojot datorprogrammu *Microsoft Excel* 2010. Precīzs izolēšanas datums bija zināms visām sekvencēm, kas tika izmantotas analīzē, un tas tika izteikts kā gads ar vienu decimālzīmi aiz komata. Nukleotīdu substitūcijas ātrums, kopīgā ciltstēva laiks (tMRCA)¹⁹, vīrusa populācijas apjoma izmaiņas un diskrētā filoģeogrāfiskā analīze tikai aprēķināti, ar laiku un lokalizāciju iezīmētām sekvencēm pielietojot Baijesa Markova ķēdes Montekarlo (MCMC)²⁰ metodi datorprogrammā BEAST²¹ v2.0.2 [Drummond et al., 2012]. Dati tika analizēti, pieņemot atslābinātu (pēc normāla logaritmiskā sadalījuma) molekulāro pulksteni, kas pieļauj nt substitūciju biežumu variācijas starp ģenētiskajām līnijām, un lietojot Baijesa apvāršņa demogrāfisko modeli kā saplūšanas sākotnējo varbūtību. MCMC ķēžu garums tika izvēlēts, lai efektīvās paraugkopas lielums būtu > 200 . MCMC analīzes rezultāti tika izvērtēti, izmantojot datorprogrammu Tracer v1.5, un maksimālās radniecības ticamības (MCC)²² filoģenētiskais koks tika konstruēts, izmantojot datorprogrammu TreeAnnotator v2.0.2. MCC koks tika vizualizēts, izmantojot datorprogrammu FigTree v1.4.0. Diskrētās

¹⁹ Time of most recent common ancestor.

²⁰ Markov chain Monte Carlo.

²¹ Bayesian evolutionary analysis sampling trees.

²² Maximum Clade Credibility.

filoģeogrāfiskās analīzes kopsavilkums difūzijas dinamiskajā diagrammā un interaktīvā animācijā tika radīti, izmantojot datorprogrammu SPREAD v1.0.6²³ [Bielejec et al., 2011], un vizualizēti, izmantojot ģeogrāfisko informācijas sistēmu ESRI ArcMap 10.1. Datu nenoteiktība tika izteikta kā 95% augstākās varbūtības blīvums, HPD²⁴.

2.6. Datu statistiskā apstrāde

2.6.1. HRSV sezonālītātes datu statistiskā apstrāde

Pētījumā viena respiratoro infekciju sezona tika definēta kā laika periods no 1. jūlija līdz nākamā gada 30. jūnijam. HRSV epidemioloģiskās aktivitātes periods, modificējot plaši lietotu definīciju, tika noteikts kā laika posms starp pirmo no divām secīgām nedēļām, kurās $\geq 10\%$ testēto paraugu ir HRSV pozitīvi, un pēdējo no divām secīgām nedēļām, kurās $\geq 10\%$ testēto paraugu ir HRSV pozitīvi, analizējot summāros trīs sezonu pacientu sadalījuma datus [Mullins et al., 2003; Panozzo et al., 2010; Terletskaia-Ladwig et al., 2005]. Paraugu sadalījumam pa nedēļām tika aprēķināta moda, mediāna un vidējais lielums ar standartnovirzi (SD). Tā kā respiratoro vīrusu sezonas šķērso gadu miju, šo datu aprēķinos gada nedēļas no 1–26 tika izteikti kā pozitīvi lielumi, bet nedēļas no 27–52 kā negatīvi, t.i. nedēļas kārtas skaitlim atņemot 52. 2009. gadā bija 53 nedēļas, šajā gadījuma 53. nedēļas dati tika pieskaitīti 52. nedēļas datiem. Lai izslēgtu datu vākšanas ietekmi uz sezonālītātes datiem, pieļaujot, ka vairāku vīrusu epidemioloģiskā aktivitātes periodi var sakrist, tika pārbaudīta Pīrsona korelācija starp HRSV pozitīvo un negatīvo paraugu sadalījumiem pa nedēļām. Visi dati tika analizēti, izmantojot datorprogrammu *Microsoft Excel* 2010.

²³ Spatial Phylogenetics Reconstruction of Evolutionary Dynamics.

²⁴ Highest probability density.

2.6.2. Klīnisko datu statistiskā apstrāde

Klīnisko datu statistiskai apstrādei tika izmantota datorprogrammas SPSS²⁵ 17.0 un *Microsoft Excel* 2010. Intervālu un rangų skalas dati tika salīdzināti, izmantojot Manna-Vitnija testu, un aprakstīti, izmantojot mediānu vai modu, kā arī norādot izkliedes intervālus. Nominālie dati tika salīdzināti, izmantojot Pīrsona χ^2 vai Fišera testu, un atainoti kā pacientu skaits un daļa, izteikta procentos. Atšķirības tika uzskatītas par statistiski nozīmīgām, ja $p < 0,05$.

²⁵ Statistical Package for Social Sciences.

3. REZULTĀTI

3.1. HRSV klīniskais raksturojums

3.1.1. Pētījuma pamatgrupa

Pacientu iekļaušana pētījuma pamatgrupā tika uzsākta 2009. gada 1. jūlijā un noslēdzās 2012. gada 30. jūnijā, respektīvi, iegūtie dati pārstāv trīs respiratoro infekciju sezonas. Kopumā pētījumā tika iekļauti 207 pacienti (67–71 pacienti sezonā). Pacientu vecuma mediāna bija 8 (starpkvartīļu izkliede 4–14) mēneši, no tiem 36% bija vecumā līdz 6 mēnešiem un kopā 68% vecumā līdz 12 mēnešiem. Vairākums no pacientiem tika uzņemti akūtās pediatrikās aprūpes nodaļās, bet seši (3%) intensīvās terapijas nodaļā. Seši pacienti (3%) tika pētījumā iekļauti atkārtoti. Katra pacienta paraugam tika piešķirts kods pēc sekojošas shēmas: LV (Latvija)/parauga numurs pēc kārtas attiecīgajā gadā/parauga ņemšanas gads.

3.1.2. HRSV diagnostika un grupu diferencēšana

Balstoties uz GenBank datubāzē publicētajām HRSV genoma sekvencēm, kā arī līdzīgu pētījumu pieredzi citās pasaules laboratorijās [Peret et al., 1998; Sullender et al., 1993], tika konstruēta virkne sintētisku oligonukleotīdu (praimeru) (2.3. tabula). PCR diagnostikas stratēģija parādīta 3.1. attēlā. Veicot primāro skrīningu, 509 bp PCR fragments bija viegli detektējams agarozes gēlā. Šādā veidā HRSV specifiskas RNS klātbūtne tika noteikta 88 (42,5%) no 207 pārbaudītajiem paraugiem. Nevienam no atkārtoti pētījumā iekļautajiem pacientiem netika konstatēta HRSV reinfekcija.

Veicot HRSV grupu diferencēšanu, praimeri tika konstruēti tā, lai HRSV-A un B varētu viegli izšķirt pēc amplificētā fragmenta garuma (3.1. attēls). Šādi tika pārbaudīti visi 88 HRSV-pozitīvie paraugi; 53 (60,2%) uzrādīja A grupai un 35 (39,8%) B grupai atbilstošu fragmenta garumu. Nevienā gadījumā netika konstatēta abu grupu ko-infekcija.

3.1. att. HRSV molekulārās diagnostikas stratēģija

A, shematiski attēlota daļa no HRSV genoma un PCR diagnostikas stratēģija; B un C, agarozes gēla elektroforēze, kas ilustrē primāro HRSV skrīningu ar praimeriem P_Fw/M_Rv (B) un HRSV pozitīvo paraugu grupu diferencēšanu (C). M, DNS molekulārās masas marķieris (Fermentas); (+) pozitīva reakcija; (-) negatīva reakcija.

Paralēli PCR analīzei, 110 pacientiem tika ņemtas arī deguna iztriepes virusoloģiskajai diagnostikai ar IFA. Šis izmeklējums neietilpa pētījuma programmā un tika veikts pēc ārstējošā ārsta ieskatiem. Šajā grupā HRSV tika diagnosticēts 40 (36,4%) pacientiem, paragripas vīruss 9 (8,2%), metapneimovīruss 6 (5,5%), gripas A vīruss (t. sk. H1N1) 3 (2,7%), kā arī pa vienam adenovīrusa un gripas B vīrusa gadījumam (0,9%). Pētījumā izstrādātā metode spēja detektēt HRSV infekciju sešos IFA-negatīvos paraugos, savukārt, tā nespēja detektēt HRSV divos IFA pozitīvos paraugos. Salīdzinot RT-PCR ar IFA kā “zelta standartu” 2×2 diagnostisko testu salīdzināšanas tabulā (3.1. tabula), tika iegūta jutība – 95,2%, specifiskums – 91,2%, pozitīvā paredzamā vērtība – 87% un negatīvā paredzamā vērtība – 97% [Feinstein, 2002].

Pieciem (6%) pacientiem ar HRSV infekciju tika noteikta koinfekcija ar citu vīrusu – diviem ar gripas A, diviem ar gripas B un vienam ar cilvēka metapneimovīrusu.

3.1. tabula

IFA un RT-PCR metožu salīdzinājums HRSV diagnostikā

		IFA		Kopā
		Pozitīvs	Negatīvs	
RT-PCR	Pozitīvs	40	6	46
	Negatīvs	2	62	64
	Kopā	42	68	110

RT-PCR – apgrieztās transkripcijas PCR; IFA – netiešās imūnfluorescences tests.

3.1.3. HRSV sezonālitate

Kopējā HRSV-pozitīvo paraugu proporcija atkarībā no sezonas bija 33,3% līdz 56,7%, bet sezonu augstākās aktivitātes periodā varēja sasniegt pat 90% (3.2. attēls).

3.2. att. HRSV pozitīvo paraugu sadalījums pa pētījuma mēnešiem

Kopējais pārbaudīto paraugu skaits (līkne) un HRSV-A (baltie stabiņi) un B (melnie stabiņi) pozitīvo paraugu skaits katrā mēnesī. Mēneši norādīti ar tā pirmo burtu, sākot no 2009. gada jūlija

Katru gadu HRSV epidēmija sākās ziemas un ieilga līdz pavasara mēnešiem. HRSV epidēmiskās aktivitātes pīķis bija 10. gada nedēļa, bet kopumā HRSV pozitīvi paraugi tika detektēti no 46. līdz 21. nedēļai (3.2. tabula).

3.2. tabula

HRSV sezonu raksturojums				
Epidēmiskā sezona	Nedēļas			
	Pirmais detektētais paraugs	Sezonas pīķis*	Pēdējais detektētais paraugs	Ilgums
2009-2010	46	9	19	26
2010-2011	52	6	21	22
2011-2012	51	10	18	20
Kopā	46	10	21	28

* Pīķis ataino HRSV pozitīvo paraugu sadalījuma pa nedēļām modu

HRSV epidemioloģiskās aktivitātes sākums tika noteikts kā pirmā no divām secīgām nedēļām, kurās $\geq 10\%$ testēto paraugu ir HRSV pozitīvi, savukārt beigas kā pēdējā no divām secīgām nedēļām, kurās $\geq 10\%$ testēto paraugu ir HRSV pozitīvi. Analizējot kopā trīs sezonu datus, HRSV epidemioloģiskās aktivitātes periods tika noteikts no 51. līdz 19. gada nedēļai, kas labi atbilda arī sadalījuma intervālam no -2 SD līdz $+2$ SD – 52. līdz 19. nedēļai. Lai izslēgtu datu vākšanas ietekmi uz sezonālītātes datiem, tika pārbaudīta korelācija starp HRSV pozitīvo un negatīvo paraugu sadalījumiem pa nedēļām, un tāda netika atrasta ($r=0,1$). Šajā pētījumā noteiktajā HRSV epidemioloģiskās aktivitātes periodā izraisīja 57% (86 no 151) dziļāko elpeļu infekcijas, 92,9% (26 no 28) bronhiolītu un 51,4% (18 no 35) pneimoniju. Savukārt, ārpus šī perioda HRSV izraisīja 3,6% (2 no 56) dziļāko elpeļu infekciju.

HRSV-A un B vīrusi paralēli cirkulēja visās trijās pētītajās sezonās. HRSV-A dominēja sezonās 2009./2010. un 2010./2011., kamēr HRSV dominēja 2011./2012. sezonā (3.3. tabula).

HRSV grupu izplatība epidēmiskajās sezonās

Epidēmiskā sezona	Pārbaudītie paraugi	HRSV-pozitīvie paraugi, sk. (%)	Paraugu skaits starp HRSV-pozitīvajiem (%)	
			HRSV-A	HRSV-B
2009-2010	69	23 (33,3)	15 (65,2)	8 (34,8)
2010-2011	67	38 (56,7)	28 (73,7)	10 (26,3)
2011-2012	71	27 (38)	10 (37)	17 (62,9)
Kopā	207	88 (42,5)	53 (60,2)	35 (39,8)

3.1.4. HRSV klīniskās pazīmes

HRSV infekcijas klīniskās pazīmes ir norādītas 3.2. attēlā. Bez sēkšanas, klepus un mitriem trokšņiem, kas daļēji ir iekļauti šī pētījuma dziļāko elpceļu infekcijas gadījuma definīcijā, lielākajai daļai pacientu ar HRSV infekciju tika novēroti arī rinīts, miegainība, samazināta ēstgriba un subkostālas retrakcijas. Cits gadījuma definīcijas kritērijs, apnoja, netika novērots pētījuma populācijā. Lielākā daļa pacientu vecāki atminējās kontaktu ar akūtas respiratoras infekcijas slimnieku.

3.2. att. HRSV izraisītu dziļāko elpceļu infekcijas klīniskais atainojums

Klīniskās pazīmes izteiktas kā HRSV pozitīvo pacientu skaits (%) ar pazīmi.

T – temperatūra, °C; SpO₂ – skābekļa saturācija mērot ar pulsoksimetru; rtg - rentgenogramma

Veicot HRSV izraisītu dziļāko elpceļu infekciju klīnisko salīdzinājumu ar citu etioloģijas grupu (respektīvi, “ne-HRSV” grupa), tika konstatēta virkne atšķirību (3.4. tabula): (i) ar HRSV inficētie pacienti bija statistiski ticami jaunāki, (ii) viņiem biežāk ģimenes anamnēzē bija atopiskas saslimšanas, bet (iii) retāk tika noteikts SIRS. Atšķīrās arī noteiktās diagnozes – HRSV biežāk izraisīja bronhiolītu, bet netika diagnosticēts nevienam no pacientiem ar obstruktīvu laringotraheītu (krupu). Savukārt, neatšķīrās neviens no lietotajiem slimības smaguma rādītājiem – prasība pēc skābekļa inhalācijas, RDNI, KSS

un hospitalizācijas ilguma. Pētījuma laikā nomira viens (0,5%) pacients ar dziļāko elpceļu infekciju, kas bija HRSV negatīvs.

3.4. tabula

HRSV izraisītu un citas etioloģijas dziļāko elpceļu infekciju klīniskais salīdzinājums

Pazīme	HRSV	Ne-HRSV	P vērtība
Pacientu skaits	88	119	
Meitenes, sk. (%)	38 (43,2)	42 (35,3)	0,249
Vecums mēnešos, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	6 (3–9,25)	10 (6–16,5)	<0,001
Svars atbilstoši vecumam, z-vērtības mediāna (starpkvartīļu izkliede)	0,69 (-0,17–1,24)	0,84 (0,04–1,36)	0,252
Pasīvā smēķēšana, sk. (%)	59 (67)	68 (57,1)	0,148
Apdzīvotības indekss, mediāna ^a (starpkvartīļu izkliede)	1,7 (1,3–2)	1,7 (1,3–2)	0,424
Atopiskas slimības ģimenē, sk. (%)	50 (56,8)	51 (42,9)	0,047
Sistēmiskā iekaisuma atbildes sindroms (SIRS), sk. (%)	17 (19,3)	79 (66,4)	0,023
Prasība pēc skābekļa, sk. (%)	27 (30,7)	46 (38,7)	0,235
Respiratorā distresa novērtēšanas instruments, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	6 (5–8)	6 (4–8)	0,839
Klīniskā smaguma skala, moda (izkliede)	1 (1–6)	1 (0–5)	0,21
Antibakteriāla terapija, sk. (%)	31 (35,2)	45 (37,8)	0,703
Stacionēšanas ilgums, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	4 (3–6)	4 (2–6)	0,651
Diagnoze			<0,001
Bronhīts	40 (45,5)	55 (46,2)	0,913
Bronhiolīts	27 (30,7)	13 (10,9)	0,001
Pneimonija	19 (21,6)	33 (27,7)	0,398
Astma	2 (2,3)	7 (5,9)	0,306
Krups	0	11 (9,2)	0,002

^a aprēķināts dalot cilvēku skaitu ģimenē ar istabu skaitu. P vērtības <0,05 norādītas trekninājumā.

58% (n=51) bērnu ar HRSV infekciju bija vecumā līdz sešiem mēnešiem, salīdzinot ar 29,4% (n=35) citas etioloģijas grupā (p<0,001), bet 79,5% (n=80) vecumā līdz gada vecumam, salīdzinot ar 64,7% (n=64) citas etioloģijas grupā (p=0,03) (3.3. attēls).

3.3. att. Vecuma struktūras pacientiem ar HRSV izraisītu un citas etioloģijas dziļāko elpceļu infekcijām

3.4. attēlā atainota resursu izmantošana HRSV izraisītās dziļāko elpceļu infekcijas ārstēšanā. Lielākajai daļai pacientu tika nozīmēti: krūškurvja rentgens, β_2 agonistu inhalācijas, intravenozs infūzs un intravenozus (n=56; 63,4%) vai inhalējamus (n=68; 77,3%) glikokortikoīdus (54 pacienti jeb 61,4% saņēma gan intravenozi, gan inhalācijās).

3.4. att. Resursu izmantošana HRSV izraisītās dziļāko elpceļu infekcijas ārstēšanā
Izteikts kā HRSV pozitīvo pacientu skaits (%), kas saņēma norādītās intervences. IV – intravenozi; ICS – inhalējamie glikokortikoīdi

Salīdzinot HRSV-A un B klīniskās pazīmes un pacientu demogrāfiskos datus, statistiski ticamas atšķirības netika konstatētas nevienā no salīdzinātajiem parametriem (3.5. tabula).

HRSV grupu A un B klīniskais salīdzinājums

Pazīme	HRSV-A	HRSV-B	P vērtība
Pacientu skaits	53	35	
Meitenes, sk. (%)	19 (35,8)	19 (54,3)	0,087
Vecums mēnešos, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	6 (3–9)	6 (3,75–12)	0,518
Svars atbilstoši vecumam, z-vērtības mediāna (starpkvartīļu izkliede)	0,53 (-0,2–1,1)	0,91 (-0,01–1,29)	0,279
Pasīvā smēķēšana, sk. (%)	37 (69,8)	22 (62,9)	0,497
Apdzīvotības indekss, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	1,7 (1,3–2,5)	1,6 (1,4–2)	0,552
Atopiskas slimības ģimenē, sk. (%)	23 (43,4)	13 (37,1)	0,633
Sistēmiskā iekaisuma atbildes sindroms (SIRS), sk. (%)	12 (22,6)	5 (14,3)	0,331
Prasība pēc skābekļa, sk. (%)	17 (32,1)	10 (28,6)	0,727
Respiratorā distresa novērtēšanas instruments, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	6 (4–8)	7 (5,5–8)	0,928
Klīniskā smaguma skala, moda (izkliede)	1 (1–5)	1 (1–6)	0,303
Antibakteriāla terapija, sk. (%)	20 (37,7)	11 (31,4)	0,544
Stacionēšanas ilgums, mediāna (starpkvartīļu izkliede)	4 (3–6)	3 (2–4,75)	0,163
Diagnoze			0,316
Bronhīts	26 (49,1)	14 (40)	0,538
Bronhiolīts	18 (34)	9 (25,7)	0,559
Pneimonija	8 (15,1)	11 (31,4)	0,119
Astma	1 (1,9)	1 (2,9)	1

3.2. HRSV molekulārais raksturojums

3.2.1. Filoģenētiskā analīze

Salīdzinot nt sekvences, 53 HRSV-A un 35 HRSV-B izolāti tika sagrupēti attiecīgi 29 un 23 dažādos celmos. Šo celmu sekvences tika izkārtotas kopā ar GenBank pieejamajām celmu sekvencēm ar iepriekš noteiktiem genotipiem. Kopumā analīzē tika iekļauti 11 HRSV-A genotipi (GA1–7 [Peret et al., 2000], SAA1 [Venter et al., 2001], NA1 un 2 [Shobugawa et al., 2009], ON1 [Eshaghi et al., 2012]) un 13 HRSV-B genotipi (GB1–4 [Peret et al., 2000], SAB1–3 [Venter et al., 2001], BA-I–VI [Trento et al., 2006]). Uz šo izkārtojumu bāzes katrai grupai atsevišķi tika veikta filoģenētiskā analīze ar NJ metodi. Abu grupu gadījumā par piemērotāko nt substitūcijas modeli tika atzīta Tamura-Nei

(TN93) metode [Tamura and Nei, 1993] ar diskrētu gamma distribūciju (formas parametrs = 4).

Latvijas HRSV-A izolāti piederēja diviem dažādiem genotipiem. 28 celmi (51 izolāts) piederēja genotipam NA1. Viens celms, kurā ietilpa divas identiskas sekvences, abas izolētas 2012. gada martā, piederēja nesen aprakstītajam genotipam ON1 (3.5. un 3.7. attēli). Šo genotipu raksturo 72 nt duplikācija HVR2 segmentā (3.8. un 3.9. attēli) [Eshaghi et al., 2012].

3.5. att. HRSV A grupas filoģenētiskais koks

Latvijas celmi ir apzīmēti ar (◆). Taksonu apzīmējumi ietver: celma nosaukumu (trekninājumā), iekavās norādītu GenBank pieejas kodu un kursīvā norādītu identisko izolātu skaitu. Sākumpalaišanas vērības, kas ≥ 70 , norādītas mezglos. Skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitu pozīcijā.

3.6. att. HRSV B grupas filoģenētiskais koks

Apzīmējumi lietoti kā 3.5. attēla aprakstā. Celmi ar 317 aminoskābju garu G proteīnu ir norādīti atsevišķi, pārējiem celmiem bija 310 aminoskābju garš G proteīns.

Visiem HRSV-B izolātiem tika konstatēta 60 nt duplikācija G gēnā, kas raksturīga BA genotipiem, un tie visi piederēja BA-IV genotipam (3.6. attēls). Kopējais HRSV izolātu sadalījums pa genotipiem analizētajās sezonās dots 3.7. attēlā.

3.7. att. HRSV izolātu sadalījums pa genotipiem analizētajās sezonās

Astoņi HRSV-A un viens HRSV-B celms bija identiski iepriekš citur izolētām sekvencēm, izmantojot NCBI-BLAST servera meklētāju (3.6. tabula) [Zhang et al., 2000]. Pārējie 43 (no 52) celmi bija Latvijai unikāli.

Iepriekš publicēti identiski celmi Latvijas 2009.–2012. gadu izolātiem

Latvijā		Pasaulē			
Celms	Sezona	Celms*	Sezona	Valsts	GenBank pieejas kods
Genotips NA1					
LV/056/10	2010-2011	NL20752227/07-08	2007-2008	Nīderlande	HQ731761
	2011-2012	Riyadh 42/2008	2008-2009	Saūda Arābija	JX131640
LV/009/11	2010-2011	08-047045	2008-2009	Nīderlande	JX015483
LV/011/11	2010-2011	A/RJ/64/2006	2006-2007	Brazīlija	JX182800
		A/RJ/288/2007	2007-2008	Brazīlija	JX182830
		A/RS/5357/2009	2009-2010	Brazīlija	JX182837
		A/WI/629-22/07	2007-2008	ASV	JF920049
		R9061/07-08	2007-2008	Lielbritānija	HQ731741
		R14944/08-09	2008-2009	Lielbritānija	HQ731736
LV/027/12	2011-2012	18227AN/2012	2011-2012	Itālija	JX988459
LV/036/12	2011-2012	18294RM/2012	2011-2012	Itālija	JX988494
		HD/70178486/11	2011-2012	Vācija	JX967562
LV/043/12	2011-2012	ON69-0310A	2009-2010	Kanāda	JN257697
		ON187-0111A	2010-2011	Kanāda	JN257701
		A/WI/629- Q0284/10	2009-2010	ASV	JF920053
		07408AN/2012	2011-2012	Itālija	JX988460
		HD/70189233/12	2011-2012	Vācija	JX967566
LV/046/12	2011-2012	16158AN/2012	2011-2012	Itālija	JX988467
Genotips ON1					
LV/029/12	2011-2012	ON138-0111A	2010-2011	Kanāda	JN257694
		0284RM/2012	2011-2012	Itālija	JX988452
		WUE/9583/12	2011-2012	Vācija	JX912363
		RSVA/GN435/11	2011-2012	Dienvīdķoreja	JX627336
		RSV/Yokohama.JPN/ /P6587/2012	2011-2012	Japāna	AB761611
Genotips BA-IV					
LV/010/11	2010-2011	BE/8844/09	2009-2010	Beļģija	JX645922

* Celmi ar 100% maksimālo identitāti NCBI-BLAST servera meklēšanā. Norādīts tikai viens celms no katras valsts attiecīgajā sezonā.

3.2.2. Genotipa NA1 molekulārais raksturojums

Genotipa NA1 Latvijas celmu HVR2 sekvenču bija savstarpēji cieši saistītas, un ģenētiskie attālumi bija 2,1% ($\pm 0,4$) un 4,1% ($\pm 0,9$) attiecīgi nt un aa līmenī. Nukleotīdu

polimorfisms kodonu pozīcijās un deducēto aa izkārtojums ir dots 3.8. attēlā. Kopumā 112 aa garajā analizētajā sekvencē 63 references celma A2 aa bija konservatīvas visos izolātos. Visiem HRSV-A celmiem bija priekšlaicīgs terminācijas kodons (TGA) 298. pozīcijā un saglabāts oriģinālais (celma A2) terminācijas kodons 299. pozīcijā (3.9. attēls). Visiem NA1 celmiem tika atklātas arī sekojošas mutācijas: $P226 \rightarrow L$, $E233 \rightarrow K$, $L258 \rightarrow H/Y$, $M262 \rightarrow E/R$, $F265 \rightarrow L$, $S269 \rightarrow T$, $S280 \rightarrow Y$, $P289 \rightarrow S$, $S290 \rightarrow P/L$, $P292 \rightarrow S$, $P293 \rightarrow S$, $P296 \rightarrow T$ un $R297 \rightarrow K$. Citas biežas (>50% celmu) mutācijas bija: $L208 \rightarrow I$, $S222 \rightarrow P$, $N237 \rightarrow D$, $I244 \rightarrow R$, $N273 \rightarrow Y/K$, $P274 \rightarrow L$ un $P286 \rightarrow L$. Vidējā ģenētiskā distance starp Latvijas celmiem un NA1 references celmu NG-016-04 (GenBank pieejas kods AB470478) bija 2,3% ($\pm 0,4$) un 4,2% ($\pm 0,9$) attiecīgi nt un aa līmenī.

Izmantojot NetOGlyc 3.1 serveri, potenciāla *O*-glikozilācija tika prognozēta 40 serīna un treonīna atlikumiem (starp individuāliem celmiem no 36 līdz 43). Analogā celma A2 sekvencē tika prognozētas 39 *O*-glikozilācijas vietas, no kurām 36 bija kopīgas ar Latvijas konsensa sekvenci. Celma A2 HVR2 segmentā ir divi potenciāli *N*-glikozilācijas motīvi (N-X-S/T) – N237 un N251. Starp Latvijas celmiem bija sastopami vēl divi motīvi – N273 un N294. NetNGlyc 1.0 serveris prognozēja tikai N251 un N294 *N*-glikozilāciju Latvijas konsensa sekvencē. Starp individuāliem celmiem prognozētās *N*-glikozilācijas pozīcijas variēja no 0 līdz 3. Tripeptīdam NLS 273. pozīcijā seko prolīns, kas šī asparagīna glikozilāciju padara maz varbūtīgu [Gupta et al., 2004], savukārt 294. pozīcijā esošā NTT glikozilācija bija šķietami atkarīga no $P286 \rightarrow L$ mutācijas. Neviena no *N*-glikozilācijas motīviem nebija kopīgs visiem izolātiem.

Lai identificētu pozitīvās selekcijas vietas, tika izmantotas piecas dažādas metodes. Kopumā 28 pozīcijās bija paaugstināta ne-sinonīmo nomaiņu (*dN*) proporcija un vidējā ne-sinonīmo/sinonīmo nomaiņu (*dN/dS*) attiecība bija 1,12, kas liecina par selekcijas spiediena klātbūtni. Neskatoties uz to, tikai divas pozīcijas, M262 un N273, tika noteiktas balstoties uz divu vai vairāk metožu konsensu (3.8. attēls, 3.7. tabula). N273 nomaiņa uz tirozīnu izjauca N-X-S/T *N*-glikozilācijas motīvu.

3.8. att. HRSV A grupas G proteīnu kodējošās sekvences polimorfisms un aminoskābju izkārtojums

Uz grafika x ass atzīmētas kodonu un atbilstošo aminoskābju pozīcijas. Y ass ataino nukleotīdu polimorfismu, kas izteikts kā π . Izkārtojums veikts atbilstoši references celma A2 sekvennei (GenBank pieejas kods M11486). Latvijas konsensa sekvence tika ģenerēta, izmantojot datorprogrammu AlignX, kas ietilpst Vector NTI Advance paketnē. Identiskās sekvences attēlotas kā punkti. Ar (*) norādīti terminācijas kodoni. Duplicētais reģions ir ietverts taisnstūrī. Prognozētās O-glikozilācijas pozīcijas ir norādītas ar (▽) references celmam A2 un ar (▼) Latvijas konsensa sekvennei. Asparaģina-X-serīna/treonīna (N-X-S/T) motīvi, kuriem tika prognozēta N-glikozilācija, ir iekrāsoti pelēki. Pozitīvās selekcijas pozīcijas ir norādītas ar (+).

HRSV-A

References celms A2

(I)

(II)

HRSV-B

References celms B1

(III)

(IV)

3.9. att. Latvijas izolātu G proteīna ektodomēna variabilitāte

Lineārais attēlojums ir balstīts uz prototipu celmu A2 un B1 sekvencēm. I, priekšlaicīgs terminācijas kodons (pasvītrotie nukleotīdi), kas terminē 297 aminoskābju garu proteīnu, ir raksturīgs visiem Latvijas HRSV-A izolātiem. II, diviem HRSV-A izolātiem tika konstatēta 72 nukleotīdu duplikācija (zaļš taisnstūris) otrajā hipervariablajā rajonā. III, sešu nukleotīdu delēcija (■), 60 nukleotīdu duplikācija un priekšlaicīgs terminācijas kodons, veidojot 310 aminoskābju garu proteīnu, ir raksturīgi lielākajai daļai Latvijas HRSV-B izolātu. IV, diviem HRSV-B izolātiem bija saglabāts oriģinālais celma B1 terminācijas kodons, šie proteīni bija 317 aminoskābju gari. Diagrammu atainojums un izmantotie simboli lietoti kā [Zlateva et al., 2005].

3.7. tabula

Kodoni zem pozitīvās selekcijas spiediena

Kodons	SLAC	FEL	IFEL	REL	MEME
HRSV-A					
<u>M262</u>	0.45	0.16	0.03	2.89	0.01
<u>N273</u>	0.59	0.08	0.09	3.42	0.08
P274	0.26	0.21	0.07	2.95	0.23
HRSV-B					
<u>L219</u>	0.06	0.09	0.04	14.36	0.11
<u>T270</u>	0.30	0.05	0.14	65.13	0.07

SLAC, FEL, IFEL un MEME statistiskā nozīmība ir izteikta ar p vērtību, bet REL ar Baijesa faktoru (BF). Vērtības trekninājumā tika uzskatītas par statistiski nozīmīgām ($p < 0,1$; $BF > 20$). Pasvītrotie kodoni atbilda divu vai vairāk metožu kritērijiem.

3.2.3. Genotipa BA-IV molekulārais raksturojums

Latvijas BA-IV genotipa celmi bija vairāk atšķirīgi ar aprēķinātajām ģenētiskajām distancēm 3,3% ($\pm 0,4$) un 4,2 % ($\pm 0,7$) attiecīgi nt un aa līmenī. Par to liecināja arī nt polimorfisma analīze (3.10. attēls), kur 23 kodonu π vērtības bija $>0,1$. Papildus raksturīgajai 20 aa „rāmja” duplikācijai HVR2 segmentā visiem Latvijas BA-IV celmiem tika konstatēta arī delēcija P159–K160 (3.9. attēls). Šī divu aa delēcija mainīja kodonu pozīciju numerāciju, kas šeit norādīta, balstoties un referenču celmiem. P159–K160 delēcijai sekoja 28 aa reģions (161.–188.), kas bija pilnībā konservatīvs Latvijas B celmos. Tika novērotas divas alternatīvas terminācijas kodonu lokalizācijas – 293. pozīcijā (TAA) vai references celma B1 (299 aa garš G proteīns) 300. pozīcijā (TAG). Tādējādi Latvijas HRSV-B vīrusi producēja 310 vai 317 aa garus G proteīnus (3.9. attēls). Celmi ar 317 aa garu G proteīnu parādījās tikai 2011./2012. sezonā un netika detektēti iepriekš. Proteīnu sekvenču izkārtojums kopā ar sākotnēji aprakstīto BA celmu BA/3833/99 ir dots 3.10. attēlā. Kopumā 171 aa garajā analizētajā sekvencē 123 references celma aa bija konservētas arī starp visiem Latvijas izolātiem. Visiem HRSV-B celmiem bija sekojošas mutācijas: *K218→T*, *L223→P* un *S247→P*. Papildus tām, biežas ($>50\%$ celmu) bija arī: *L219→P*, *T270→I/F*, *V271→A*, *H287→Y* un *Q313→Stop*. Vidējā ģenētiskā distance starp Latvijas BA celmiem un references celmu BA/3833/99 bija 4,2% ($\pm 0,6$) un 5,2% ($\pm 0,9$) attiecīgi nt un aa līmenī. Vairākas būtiskas atšķirības tika novērotas duplicitajā segmentā, kas vairs nebija tieša sākotnējās sekvences kopija (3.10. attēls).

NetOGlyc 3.1 serveris prognozēja 44 serīna un treonīna atlikumu *O*-glikozilāciju Latvijas konsensa sekvencē (36–50 starp individuāliem celmiem) un 41 analogā celma BA/3833/99 sekvencē. Tikai 16 no paredzētajām *O*-glikozilācijas pozīcijām sakrita ar HRSV-A konsensa sekvenci. Celma BA/3833/99 HVR2 segmentā ir divi potenciāli *N*-glikozilācijas motīvi – N296 un N310. N296 bija konservatīvs un tā glikozilācija tika prognozēta visiem Latvijas celmiem, bet N310 glikozilācija tika prognozēta tikai 317 aa garajās sekvencēs. Celmam LV/057/10 bija uzreiz trīs papildus N-X-S/T motīvi (N212, N230 un N253), no kuriem diviem (N212 un N230) tika prognozēta *N*-glikozilācija.

Kopumā 32 pozīcijās bija paaugstināta ne-sinonīmo nomaiņu (*dN*) proporcija, un vidējā ne-sinonīmo/sinonīmo nomaiņu (*dN/dS*) attiecība bija 0,45. Balstoties uz divu metožu sakritību, diviem kodoniem, L219 un T270, tika konstatēts pozitīvās selekcijas spiediens. T270 atrodas duplicētajā segmentā (3.10. attēls un 3.7. tabula).

3.2.4. Genotipa ON1 globālā filodinamika un filoģeogrāfija

Divi vienādi HRSV-A izolāti (LV/029/12) piederēja nesen aprakstītajam genotipam ON1, un to sekvenču bija identiskas sākotnēji aprakstītā izolāta sekvenču no Kanādas. Genotipu ON1 raksturo 72 nt duplikācija HVR2 segmentā, kas izraisa *indel* mutāciju E284→G un duplikāciju Q261–S283, pagarinot G proteīnu par 24 aa [Eshaghi et al., 2012]. Tā kā šim genotipam, tāpat kā NA1, ir priekšlaicīgs terminācijas kodons, rezultējošais G proteīna garums ir 321 aa (3.8. un 3.9. attēli). Duplicētais reģions saturēja septiņus papildus *O*-glikozilācijas recipientus, bet tas kavēja N318(294) *N*-glikozilāciju (3.9. attēls).

ON1 izolāti tika iegūti no diviem savstarpēji nesaistītiem pacientiem, kas bija hospitalizēti BKUS 2012. gada martā. Šie pacienti tika stacionēti dažādos laikos un atradās dažādās slimnīcas nodaļās, t.i. nebija saistāmi ar nozokomiālu pārnesi. Kopš atklāšanas Kanādā 2011. gadā, šis jaunais genotips ir izolēts vismaz deviņās dažādās valstīs Ziemeļamerikā, Eiropā, Āfrikā, Āzijā un Okeānijā. Kopumā līdz 2013. gada jūnijam GenBank bija pieejamas 42 sekvenču, 16 no tām bija identiskas celmam ON67-1210A, un ģenētiskās distances starp tām bija ļoti mazas – 0,8% ($\pm 0,2$) un 1,5% ($\pm 0,5$) attiecīgi nt un

aa līmenī [Cui et al., 2013; Eshaghi et al., 2012; Khor et al., 2013; Lee et al., 2012; Prifert et al., 2013; Valley-Omar et al., 2013].

No GenBank iegūtās un Latvijas ON1 sekvences tika izkārtotas un izmantotas, lai veiktu ģenētisko distanču lineārās regresijas analīzi kā laika funkciju. Lai aprēķinātu ģenētiskās distancas, tika konstruēts ML filoģenētiskais koks, un par piemērotāko nt substitūcijas modeli šai datu kopai tika atzīta Hasegavas, Kišino un Jano (HKY85) metode [Hasegawa et al., 1985] ar diskreto gamma distribūciju (formas parametrs = 4). Korelācija starp ģenētiskajām distancēm un izolēšanas laiku bija vāja ($R^2=0,21$), bet statistiski nozīmīga ($p=0,002$), tādēļ tika pieņemts, ka ON1 evolūcija laikā atbilst molekulārajam pulkstenim (3.11. attēls).

3.11. att. Genotipa ON1 izolātu ģenētiskā novirze laikā

Uz y ass atainota ģenētiskā distance no filoģenētiskā koka saknes. tMRCA – pēc šīs analīzes aprēķinātais kopīgā ciltstēva laiks bija 2010. gada oktobris

Lai aprēķinātu maksimālās radniecības ticamības (MCC) filoģenētisko koku (3.12. attēls), tika ģenerēti 50 miljonu MCMC paraugi, līdz tika iegūta statistiska konverģence. HVR2 segmenta evolūcijas ātrums tika aprēķināts $7,92 \times 10^{-3}$ nt substitūcijas/pozīcijā/gadā

(95% HPD: 2.97×10^{-3} – 1.28×10^{-2}), un kopīgā ciltstēva laiks (tMRCA) tika aprēķināts 2010. gada augusts (95% HPD: 2009. gada septembris – 2011. gada janvāris).

Filoģeogrāfiskā analīze ar labu statistisko atbalstu liecina, ka vīruss sākotnēji izplatījies no Kanādas uz Itāliju un Vāciju un tālāk uz pārējo pasauli (aposteriorā varbūtība $>0,7$). Ticama ir arī vīrusa diseminācija no Vācijas uz Japānu un atgriešanās Vācijā no Dienvidkorejas un Japānas. Tomēr šī vīrusa migrāciju uz Latviju caur Malaiziju ir ar mazu statistisko atbalstu (aposteriorā varbūtība 0,03; 3.12.). Baijesa apvāršņa grafiks tika izmantots, lai rekonstruētu genotipa ON1 populācijas dinamiku. ON1 efektīvās populācijas izmērs lēni pieauga, sasniedza plato 2012. gada sākumā un nedaudz samazinājās pirms 2012./2013. sezonas (3.12. attēls).

3.12. att. Genotipa ON1 diskretā filoģeogrāfiskā analīze un demogrāfiskā vēsture

Maksimālās radniecības ticamības (MCC) filoģenētiskais koks (augšējais panelis) un Baijesa apvēršņa grafiks (BSP; apakšējais panelis). Zaru krāsa norāda uz lokalizāciju (skat. leģendu), un platums korelē ar aposterioro varbūtību (vērtības $>0,7$ ir norādītas mezglos). BSP y ass norāda uz populācijas izmēru, kas izteikts efektīvās populācijas (N_e) reizinājumā ar paaudzes ilgumu gados (τ), iegūtā vērtība ir proporcionāla incidencei [Frost and Volc, 2010]. Sarkanā nepārtrauktā līnija atbilst mediānai, un laukums starp punktētajām līnijām atbilst 95% HPD robežām. Abi grafiki ir atainoti vienā laika skalā. Taksonu nosaukumi kodē izolēšanas valsti, numuru un laiku.

4. DISKUSIJA

4.1. Pētījuma pamatgrupa

Šajā pētījumā tika prospektīvi iekļauti Latvijas vienīgās terciārā līmeņa bērnu slimnīcas, BKUS, populācija ar dziļāko elpceļu infekciju atbilstoši PVO gadījuma definīcijai. Pētījuma veikšanas laikā HRSV diagnostikas standarts BKUS bija IFA tests, kas tika sūtīts uz citu iestādi (LIC laboratoriju), līdz ar to testa rezultāta atgriešanās laiks parasti bija vairākas dienas, un pacientu iekļaušanas laikā pētījumā nebija zināma IFA atbilde (neviens no gadījumiem). Pētījumā tika iekļauti tikai iepriekš veseli bērni ar vecuma kritēriju 2–24 mēnešiem. Tam bija vairāki iemesli: (1) praktiski visi bērni, kas vecāki par diviem gadiem, ir vismaz vienreiz pārslimojuši HRSV; (2) bērniem, kas jaunāki par diviem mēnešiem, elpošanas darbu būtiski ietekmē vairāki faktori; (3) tā paša apsvēruma dēļ netika iekļauti pacienti ar hroniskām pavadošām slimībām; (4) ņemot vērā iepriekšējos faktorus, būtu apgrūtināts objektīvs klīniskās gaitas salīdzinājums starp pacientu grupām. Neiznestība, iedzimta sirdskaite un hroniska elpceļu saslimšana ir būtiski HRSV infekcijas morbiditātes un mortalitātes riska faktori [Simões and Carbonell-Estrany, 2003], tomēr absolūti lielākā daļa zīdaiņu ar HRSV infekciju ir bijuši iepriekš veseli, un kontroles pasākumu ieviešanai būtu jābūt primāri vērstai tieši uz šīs grupas pirmreizēju saskari ar HRSV [Anderson et al., 2013; Hall et al., 2009]. Slimības ilgums vairāk kā 10 dienas tika izvēlēts par izslēgšanas kritēriju, jo HRSV RNS deguna sekrētos ir detektējama vidēji līdz 11 dienai [von Linstow et al., 2006]. Pētījuma laiks trīs respiratoro infekciju sezonas tika uzskatīts par pietiekamu, lai noteiktu galveno antigēno grupu mainību.

4.2. HRSV diagnostika

Pētījuma vajadzībām tika izstrādāta jauna klīnisko paraugu savākšanas metode virusoloģiskajām analīzēm BKUS – NFA. Lietojot vienādus virālās diagnostikas testus, NFA paraugu lietošana var palielināt jutību pat par 30%, salīdzinot ar deguna iztriepi [Macfarlane et al., 2005].

Pēdējo gadu laikā šūnu kultūra, kas agrāk tika uzskatīta par respiratoro vīrusu diagnostikas zelta standartu, daudzviet ir nomainīta ar nukleīnskābju amplifikācijas testiem, kuru jutīgums sasniedz pat 100% [Henrickson et al., 2007]. Šajā pētījumā izstrādātais RT-PCR diagnostikas protokols ļauj ne tikai precīzi diagnosticēt HRSV infekciju klīniskajos paraugos, bet ir arī ērti izmantojams ātrai HRSV grupu diferencēšanai. Virālā RNS no NFA paraugiem tika izmantota par pamatu, uz kā tika veikta cDNS sintēze ar praimeru, kas atbilda abām HRSV grupām. Šie paraugi tika tālāk skrīnēti PCR ar grupu specifiskiem praimeriem. Šādā veidā ar RT-PCR metodi HRSV nukleīnskābes klātbūtne tika noteikta sešiem paraugiem, kas ar IFA tika traktēti kā negatīvi. Divos gadījumos RT-PCR nediagnosticēja HRSV IFA pozitīvos paraugos. Tas varētu būt skaidrojams ar RNāžu klātbūtni, PCR inhibitoru klātbūtni vai RNS nestabilitāti [Gilbert et al., 1996], kas bieži novērojama atkārtoti sasaldētos un atkausētos paraugos. Šajā pētījumā paraugi tika sasaldēti-atsaldēti divos ciklos: respiratorie paraugi tika iesaldēti pēc savākšanas; atsaldēti, lai izdalītu RNS, kas atkal tika iesaldēta līdz cDNS sintēzei. Lai arī sasaldēšanu-atkausēšanu līdz trīs reizēm pieļauj RNS izolācijas komplekta ražotāja protokols (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN), nav izslēgta tās negatīvā ietekme. Turpmākie darba etapi tika veikti uz cDNS bāzes, kas ir ievērojami stabilāka. Galvenā RT-PCR priekšrocība, salīdzinot ar IFA, ir spēja diagnosticēt vīrusa nukleīnskābes klātbūtni arī ļoti zemā koncentrācijā, kā arī detektēt replicēties nespējīgu vīrusu. Iespēja, ka RT-PCR dotu viltus pozitīvu atbildi, ir atkarīga no praimeru specifiskuma, bet kopumā ir vērtējama kā ļoti zema [Liolios et al., 2001]. Ņemot vērā visus šos apsvērumus, 95,2% jutība un 91,2% specifiskums, salīdzinot ar IFA kā „zelta standartu”, tika uzskatīti par pietiekošiem pētnieciskajiem darba uzdevumiem.

HRSV epidemioloģija Eiropas valstīs ir samērā konstanta. Hospitalizētiem bērniem zem divu gadu vecuma ar dziļāko elpceļu infekciju, HRSV ir ierosinātais 42–45% gadījumu [Simões and Carbonell-Estrany, 2003]. Šī pētījuma populācijā rezultāti bija līdzīgi – HRSV izraisīja 42,5% dziļāko elpceļu infekciju. Zemāks HRSV izolācijas biežums 2009./2010. sezonā ir izskaidrojams ar gripas vīrusa A H1N1 pandēmiju [Nikiforova et al., 2011].

4.3. HRSV sezonālitate

HRSV sezonālā aktivitāte Latvijā konstanti sākās vēlāk ziemā un ieilga pavasarī (janvāris – aprīlis), salīdzinot ar vidējo sezonālo aktivitāti (decembris – februāris) ziemeļu puslodē [Bloom-Feshbach et al., 2013], bet bija līdzīga novērojumiem Krievijā [Tatochenko et al., 2010] un bienālajām „vēlajām” sezonām, kas aprakstītas vairākās Eiropas valstīs – Zviedrijā, Somijā, Vācijā, Šveicē, Austrijā un Horvātijā [Mlinaric-Galinovic et al., 2012; Reyes et al., 1997]. Latvijā HRSV sezonas bija monofāziskas, un trīs aplūkotajās sezonās to sākums un beigas lielā mērā sakrita. Ģeogrāfiskās HRSV sezonālitates atšķirības nav labi izskaidrotas, bet, domājams, ir saistītas ar lokāliem klimatiskajiem un cilvēku sociāli-kulturālajiem aspektiem [Stensballe et al., 2003].

Latvijā HRSV epidemioloģiskie un slimības sloga dati nav zināmi. Slimību profilakses un kontroles centra (SPKC) Epidemioloģijas biļetenā „Pārskats par akūto augšējo elpceļu infekciju (AAEI) un gripas izplatību Latvijā” tiek norādīts kopējais HRSV pozitīvi testēto paraugu skaits LIC laboratorijā bez atsevišķi izdalītiem citiem epidemioloģiskajiem parametriem. Šī pētījuma (88 HRSV pozitīvi paraugi) un SPKC 2009.–2012. sezonu kumulatīvo datu (1297 HRSV pozitīvi paraugi; <http://www.spkc.gov.lv/>) salīdzinājums ir dots 4.1. attēlā [Nikiforova un Kantsone, 2011; Nikiforova et al., 2010; Nikiforova and Pulmane, 2012].

4.1. att. Sezonālītātes datu salīdzinājums ar Slimību profilakses un kontroles centra datiem

Normalizētas novēroto datu histogrammas attēlo relatīvos HRSV pozitīvo paraugu sadalījumu blīvumus vienā skalā. Uz x ass attēlotas gada nedēļas. LIC – SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” stacionāra „Latvijas Infektoloģijas centrs” laboratorijas dati; BKUS – šī pētījuma dati. Ar biezo melno līniju norādīts kopējais HRSV epidemioloģiskās aktivitātes periods trīs sezonu laikā šajā pētījumā (51. – 19. nedēļa). Ar sarkano bultu norādīts efektīvais palivizumaba profilakses periods, ja tā aplikācija ir balstīta uz pašreizējām ASV vadlīnijām, pieņemot, ka tā efekts ilgst 45 dienas pēc pēdējās injekcijas [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 2009; Panozzo et al., 2010].

Pacientu skaita sadalījums pa nedēļām starp šīm divām datu kopām labi korelēja ($r=0,87; p<0,001$). Pēc SPKC datiem atsevišķi HRSV pozitīvi paraugi tiek detektēti jau sākot no 40. nedēļas, tomēr pamatā aktivitāte ($-2SD$ līdz $+2SD$) bija līdzīgā kā šajā pētījumā – no 50. līdz 20. nedēļai, ar nedaudz agrāku pīķi 8. nedēļā (moda), bet vienādu mediānu (10. nedēļa). HRSV sezonas garums 21 nedēļa atbilst globālajiem datiem [Bloom-Feshbach et al., 2013].

Palivizumaba profilakse būtiski samazina hospitalizācijas biežumu gan augsta riska, gan citādi veseliem zīdaiņiem HRSV sezonas laikā. Tomēr neviens randomizēts kontrolēts pētījums nav uzrādījis, ka tas samazinātu mirstību, un arī ekonomiskais ieguvums, ņemot vērā tā lielās izmaksas (Latvijā aptuveni LVL 5000 sezonā uz pacientu; <http://www.zva.gov.lv/>), nav viennozīmīgs [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 2009]. Latvijā nav ieviestas valsts līmeņa palivizumaba pielietošanas vadlīnijas, un tā lietošana lielā mērā balstās uz Eiropas un ASV literatūras datiem. Pēc šī pētījuma rezultātiem, kurus apstiprina SPKC dati, palivizumaba pirmā deva

Latvijas apstākļos tiek dota >30 dienas pirms sezonas sākuma, savukārt >45 dienas pēc pēdējās devas joprojām ir vērojama HRSV aktivitāte (4.1. attēls). Vairāk kā piecas devas Amerikas Pediātru akadēmija nerekomendē lietot preparāta lielās dārdzības dēļ [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 2009]. Tomēr jābūt piesardzīgam, šos datus interpretējot sabiedrības mērogā. Šajā pētījumā tika analizēti agrīna vecuma stacionēti bērni, no kuriem gandrīz 70% bija kontakts ar infekciju slimnieku, kas varētu liecināt, ka vecākiem ambulatoriem pacientiem (bērnudārza vecumā) HRSV aktivitāte sākas agrāk. Precizēti dati ļautu labāk pasargāt augsta riska pacientus un ietaupīt lielās palivizumaba profilakses izmaksas, tādēļ nepieciešams populācijas mēroga HRSV epidemioloģisks pētījums, lai precīzi noteiktu tā sezonalitāti un slimības slogu Latvijā.

4.4. HRSV klīnisko pazīmju raksturojums

Šī pētījuma pacientu kohorta bija salīdzinoši homogēna – 2–24 mēnešus veci, iepriekš veseli bērni, kas stacionēti ar dziļāko elpceļu infekciju. Pamatā klīniskās pazīmes atbilda bronhiolīta ainai un gandrīz visiem pacientiem (>90%) bija klepus, rinīts un sēkšana. Sezonas laikā HRSV izraisīja vairāk kā 90% bronhiolītu un 50% pneimoniju, kas vēlreiz pasvītīro šī patogēna lielo nozīmību agrīnu vecuma bērnu morbiditātē.

Salīdzinot ar „ne-HRSV” dziļāko elpceļu infekciju, HRSV inficētie pacienti bija jaunāki, viņiem retāk bija SIRS sindroms, bet biežāk atopiskas slimības ģimenes anamnēzē. Vairākos dziļāko elpceļu infekcijas etioloģijas pētījumos HRSV inficētie pacienti ir jaunāki par citas etioloģijas grupu, piemēram, lielā populāciju pētījuma Gvatemalā vecumu attiecība bija identiska kā šajā pētījumā (6 pret 10 mēnešiem) [Fisher Langley et al., 2013]. Augstā titrā mātes antivielas var pasargāt bērnu no inficēšanās ar HRSV, tomēr to titrs pirmo dzīves mēnešu laikā samazinās līdz nepasargājošam līmenim [Brandenburg et al., 1997]. Ir vairākas hipotēzes, kas izskaidro, kāpēc pirmajos dzīves mēnešos bērniem ir paaugstināts risks smagai HRSV izraisītai dziļāko elpceļu infekcijai: (i) imūnie mehānismi – III tipa imūnkompleksu veidošanās plaušās starp mātes IgG antivielām un HRSV antigēniem; zems sekretorā IgA līmenis; šūnu mediēta IV tipa imūnā reakcija plaušās; T-

šūnu neatkarīgie mehānismi, kuros iesaistīti makrofāgi, MIP 1 α ²⁶ un citi citokīni; (ii) fizioloģiskie mehānismi – šauri elpceļi, kuros neliela obstrukcija rada proporcionāli lielākas pārmaiņas šķērsgriezuma laukumā [Sommer et al., 2011]. HRSV asociācija ar astmu ir daudz diskutēta. No vienas puses, pēc smagas HRSV infekcijas bieži novērojamas atkārtotas sēkšanas epizodes un astma, no otras – HRSV infekcijas smagāk izpaužas atopiskiem bērniem. SIRS sindroms „ne-HRSV” grupā bija biežāk, jo, iespējams, tajā ietilpa arī bakteriālas dabas dziļāko elpceļu infekcijas.

Zināmi riska faktori kā vīriešu dzimums un saspiesti dzīves apstākļi (apdzīvotība) [Simões, 2003] šajā pētījumā nebija saistīti ar lielāku HRSV risku, savukārt citi faktori kā neiznestība, neiznēsāta bērna hroniska plaušu slimība, hemodinamiski nozīmīga iedzimta sirdskaite [Resch et al., 2002], trisomija 21 [Bloemers et al., 2007], neiromuskulāras slimības un imūndeficīts [Resch et al., 2009] pētījuma uzbūves dēļ nevarēja tikt izvērtēti.

2006. gadā Amerikas Pediatrijas akadēmija izdeva bronhiolīta ārstēšanas vadlīnijas, kuru galvenais mērķis bija ierobežot resursu izmantošanu, t.i. tās rekomendēja pret rutīnas radioloģiskās attēldiagnostikas (pierādījumu līmenis B) un bronhodilatatoru (pierādījumu līmenis B) un glikokortikoīdu (pierādījumu līmenis B) lietošanu [American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis, 2006]. 2011. gadā BKUS tika izstrādātas vietējās bronhiolīta un sadzīvē iegūtās pneimonijas vadlīnijas, kas lielā mērā ir līdzīgas Amerikas vadlīnijām. Šajā pētījumā HRSV izraisītas dziļāko elpceļu infekcijas ārstēšana bija resursu ietilpīga – galvenokārt tieši plaši pielietoto krūškurvja rentgenogrammu, inhalējamo β_2 agonistu, glikokortikoīdu un antibiotiku dēļ. Šīm atšķirībām no starptautiskajām vadlīnijām var būt vairāki skaidrojumi: (i) IFA atbildes laiks bija vairākas dienas, kuru laikā pacientam diagnoze bija neskaidra; (ii) pētījuma laikā BKUS vēl nebija ieviestas bronhiolīta un sadzīvē iegūtās pneimonijas vadlīnijas; (iii) 56,8% ar HRSV infekciju bija atopiskas slimības ģimenes anamnēzē, kas varētu likt domāt vairāk par reaktīvu elpceļu slimību; (iv) pētījumā tika iekļauts viss dziļāko elpceļu infekciju spektrs, ne tikai bronhiolīts; (v) pētījumā tika iekļauti tikai stacionēti bērni ar smagāku slimības izpausmi. Tomēr pētījumā iekļautie pacienti bija iepriekš veseli, un klīniskās diagnostikas grūtībām nevajadzēja būt, turklāt vairāk kā 75% pacientu izrakstīšanas diagnoze bija bronhīts vai bronhiolīts. Šo tendenci būtu nepieciešams pētīt atkārtoti pēc

²⁶ Macrophage Inflammatory Protein 1 α .

vadlīniju ieviešanas, jo citu valstu pieredze liecina, ka nerekomendēto terapiju lietošana pēc to ieviešanas būtiski nesamazinājās [Johnson et al., 2013].

4.5. HRSV grupu un genotipu klīniskais raksturojums

HRSV-pozitīvie paraugi tika analizēti ar HRSV-A un B specifiskiem praimeriem. Šī metode ļāva noteikt grupu piederību visiem analizētajiem paraugiem. Metodes specifiskums tika pārbaudīts ar paraugu sekvenēšanu, un visos gadījumos iegūtās sekvences atbilda iepriekš noteiktajai grupai. Abu grupu vīrusi cirkulēja paralēli visās trijās analizētajās sezonās. HRSV-A celmi tika izolēti biežāk, un tie dominēja pirmajās divās pētījuma sezonās. Dažādas grupu cirkulācijas īpatnības ir aprakstītas, tomēr kopumā tās seko noteiktam modelim, kur 1–3 secīgas HRSV-A dominantās sezonas nomaina viena HRSV-B dominanta sezona [Venter et al., 2001; Zlateva et al., 2007]. Iemesls šādai alternējošai cirkulācijai nav līdz galam izpētīts, tomēr, matemātiski modelējot periodisku dominējošās grupas nomaiņu, var izskaidrot ar zemāku saimniekorganisma uzņēmību pret homologu celmu reinfekciju kā pret heterologu [Sande et al., 2013; White et al., 2005]. Abu vīrusu pīķa aktivitāte noritēja vienlaicīgi, un netika novērota korelācija starp epidemioloģisko nedēļu un HRSV grupu.

3.5. tabulā dots HRSV-A un B infekciju klīniskais salīdzinājums, bet tā kā 97,7% izolātu piederēja diviem dominantajiem genotipiem, NA1 un BA-IV, tad būtībā ir salīdzināti šie divi genotipi (izņemot ON1 no kopējās analīzes, rezultāti būtiski nemainījās). Lai analizētu šo genotipu klīnisko nozīmību, kā primārais iznākums tika ņemts hospitalizācijas ilgums, bet KSS kā slimības smaguma mērījums. Nevienā no šiem parametriem abas grupas neatšķīrās, tādējādi tika noraidīta darba 2. hipotēze. Iespējams, šajā pētījumā statistiski ticamas atšķirības starp grupām (un genotipiem) netika atrastas, jo tika iekļauti tikai hospitalizēti pacienti, tādējādi izslēdzot no analīzes mazāk akūtus pacientus. Lai arī katra genotipa ietvaros bija atsevišķi klasteri ar augstām sākumpalaišanas vērtībām (skat. 3.5. un 3.6. attēlu), tie atsevišķi netika analizēti salīdzinoši mazā paraugu skaita dēļ.

Līdzīgā veidā Martinello ar kolēģiem analizēja atsevišķu genotipu nozīmi, izmantojot KSS [Martinello et al., 2002]. Šajā pētījumā tika novērots, ka GA3 genotipa vīrusi izraisa statistiski ticami smagāku infekciju, salīdzinot ar GA2 un GA4, bet šādas atšķirības netika novērotas starp galvenajām grupām, A un B. Turklāt pēdējos gados pasaulē no šiem genotipiem turpina cirkulēt tikai GA2 [Houspie et al., 2013]. Diagnosticējot HRSV-A un B grupas pēc reakcijas ar monoklonālajām antivielām, gan Volšs ar kolēģiem, gan Imazs ar kolēģiem konstatēja, ka smagāka infekcija bija pacientiem ar A grupas vīrusu infekciju [Imaz et al., 2000; Walsh et al., 1997], līdzīgi kā Trans ar kolēģiem Vjetnamā, lietojot PCR [Tran et al., 2013]. Liela mēroga multicentru pētījumā neatliekamās palīdzības nodaļās ASV, iekļaujot vairāk kā 4000 bērnu ar elpceļu infekcijām, Džafrijs ar kolēģiem konstatēja, ka HRSV-A pacienti biežāk tiek hospitalizēti (47,7% pret 35,8%; $p < 0,001$), bet hospitalizētie HRSV-A pacienti retāk saņem antibiotikas (32,4% pret 47,8%; $p < 0,001$) [Jafri et al., 2013]. Tas ir pagaidām lielākais šāda rakstura pētījums ar vislielāko statistisko atbalstu. Pretēji tam Hornslets secināja, ka HRSV-B ir asociēts ar smagāku slimības gaitu [Hornsleth, 1998]. Visbeidzot ir vairāki pētījumi, kur atšķirības starp HRSV grupām un atsevišķiem genotipiem netika novērotas [Kneyber et al., 1996; McIntosh et al., 1993; Wang et al., 1995; Zhang et al., 2010]. Pašreizējais pierādījumu līmenis neļauj pieņemt klīniski nozīmīgus lēmumus, balstoties uz HRSV genotipisko analīzi, vai koncentrēties uz viena konkrēta genotipa ierobežošanu. Tāpat ir skaidrs, ka, lai arī HRSV-A izraisa smagāku slimību, efektīvai vakcīnai ir jābūt pasargājošai pret abu grupu infekcijām.

4.6. HRSV celmu molekulārā analīze

2009./2010. gadu respiratoro infekciju sezonas HRSV paraugiem tika sekvenēts pilna garuma ļoti variablais G gēns, bet nākamo divu sezonu izolātiem tikai HVR2 segments. HVR2 ir ideāli piemērots molekulārās epidemioloģijas pētījumiem, jo tā mainība salīdzinoši nelielā genoma fragmentā (mazāk kā 2% no kopējās genoma sekvences) ataino kopējo vīrusa mainību [Rebuffo-Scheer et al., 2011; Tan et al., 2012]. Visas unikālās analizēto paraugu sekvences tika reģistrētas GenBank datu bāzē. Vairākas sekvences bija

identiskas gan Latvijas celmu ietvaros (skat. 3.5. un 3.6. attēlus), gan ar celmiem, kas izolēti dažādās citās pasaules valstīs (skat. 3.6. tabulu). Tas liecina, ka dažiem uzliesmojuma celmiem nav ģeogrāfisku ierobežojumu un tie var palikt stabili vairākas sezonas pēc kārtas. Tā, piemēram, celms LV/056/10, kurā ietilpa deviņi izolāti, Latvijā cirkulēja 2009./2010. un 2010./2011. sezonās, bet pasaulē tas sastopams jau kopš 2007./2008. sezonas un ir detektēts tik attālās vietās kā Nīderlande un Saūda Arābija (3.6. tabula).

Latvijas un iepriekš publicētas HVR2 sekvences ar noteiktiem genotipiem tika ņemtas par pamatu filoģenētiskajai analīzei. Katrā grupā bija viens genotips, NA1 grupā A un BA-IV grupā B, kas dominēja visu trīs sezonu laikā. Ļoti līdzīgs genotipu sadalījums tika novērots līdzīgos pētījumos citās valstīs (4.1. tabula, 4.2. attēls). Tādējādi netika noraidīta darba 1. hipotēze.

Globālā HRSV genotipu izplatība 2009. – 2012. sezonās pēc literatūras datiem

Pētījums	Valsts, iekļautie pacienti un sezonas	HRSV izplatība	HRSV-A genotipi	HRSV-B genotipi
Agoti et al., 2013	Kenija Stacionēti bērni, <5 g.v. 2002.–2012.	Nav datu		N=168 BA (98%) GB3 (2%)
Baek et al., 2012	Dienvīdkoreja Stacionēti bērni, 3 m.v.–6 g.v. 2008.–2010.	30,8%	N=84 GA5 (4%) NA1 (80%) CB-A (17%)	N=62 BA (94%) CB-B (6%)
Cui et al., 2013	Kīna Stacionēti bērni, visi vecumi 2012. gads	8,4%	N=10 NA1 (70%) ON1 (30%)	Nav datu
Dapat et al., 2010	Japāna Ambulatori bērni, visi vecumi 2009./2010. sezona	Nav datu	Nav datu	N=36 BA (100%)
Eshaghi et al., 2012	Kanāda Stacionēti bērni, visi vecumi 2010./2011. sezona	Nav datu	N=112 NA1 (88%) GA5 (2%) ON1 (10%)	Nav datu
Etemadi et al., 2013	Malaizija Stacionēti bērni ar dziļāko elpceļu infekciju, <5 g.v. 2009. gads	50%	N=9 NA1 (100%)	N=23 BA (100%)
Geis et al., 2013	Vācija Pieaugšie hematoloģijas nodaļā un stacionēti bērni, visi vecumi 2011./2012. sezona	Nav datu	N=44 GA2 (100%)	N=3 BA (100%)
Houspie et al., 2013	Beļģija Stacionēti visa vecuma bērni un pieaugušie 2009.–2011. sezonas	Nav datu	N=355 GA2 (99%) GA5 (1%)	N=131 BA (100%)
Khor et al., 2013	Malaizija, Stacionēti visu vecumu bērni 2009.–2011. sezonas	Nav datu	N=27 NA1 (93%) GA5 (4%) ON1 (4%)	N=9 BA (100%)

4.1. tabulas nobeigums

Kushibuchi et al., 2013	Japāna Stacionēti bērni ar akūtām elpceļu infekcijām, <16 g.v. 2009.–2011. sezonas	7,4%	N=14 NA1 (100%)	N=16 BA (94%) GB2 (6%)
Ohno et al., 2013	Filipīnas Stacionēti bērni ar dziļāko elpceļu infekcijām, 7 d.v.–14 g.v. 2009.–2011. sezonas	19,3%	N=54 NA1 (100%)	N=74 BA (100%)
Prifert et al., 2013	Vācija Stacionēti bērni akūtām elpceļu infekcijām, visi vecumi 2010.–2012. sezonas	Nav datu	N=197 GA2 (95%) ON1 (5%)	N=158 BA (100%)
Qin et al., 2013	Kīna Stacionēti bērni ar akūtām elpceļu infekcijām, visi vecumi 2009.–2011. sezonas	22,8%	N=9 GA2 (100%)	N=16 GB2 (44%) BA (56%)
Rebuffo-Scheer et al., 2011	ASV Ambulatori un stacionēti bērni ar akūtām elpceļu infekcijām, visi vecumi 2009./2010. sezona	Nav datu	N=4 GA2 (100%)	N=2 BA (100%)
Tran et al., 2013	Vjetnama Stacionēti bērni ar akūtām elpceļu infekcijām, <15 g.v. 2010./2011. sezona	23,8%	N=27 GA2 (100%)	N=19 BA (100%)
Valley-Omar et al., 2013	Dienvīdāfrika Stacionēti bērni ar akūtām elpceļu infekcijām, visi vecumi 2011./2012. sezona	Nav datu	N=127 NA1 (94%) ON1 (6%)	
Yoshida et al., 2012	Japāna Gan ambulatori, gan stacionēti visu vecumu pacienti ar akūtām elpceļu infekcijām 2009./2010. sezona	7,1%	N=34 GA2 (100%)	N=16 BA (100%)
Šis pētījums	Latvija Stacionēti bērni ar dziļāko elpceļu infekciju, <2 g.v. 2009.–2012. sezonas	42,5%	N=53 NA1 (96%) ON1 (4%)	N=35 BA (100%)

4.2. att. Globālā HRSV genotipu izplatība 2009.–2012. sezonās

4.1. tabulas kopsavilkums, genotipu proporcijas grupu ietvaros, izteiktas procentos. Genotipi GA2 un NA1 vairākos pētījumos netika atsevišķi izdalīti, tādēļ abi attēloti vienā krāsā

NA1 genotips pirmo reizi tika aprakstīts Japānā 2004./2005. sezonā [Shobugawa et al., 2009], un turpmākajos gados vairākos HRSV molekulārās epidemioloģijas pētījumos tas noteikts kā dominējošais HRSV-A genotips (skat. 4.1. tabulu). NA1 genotips ir ģenētiski tuvs GA2 genotipam un netiek viennozīmīgi atsevišķi izdalīts [van Niekerk and Venter, 2011; Yoshida et al., 2012]. To ņemot vērā, GA2 un GA5 ir vairākus gadus bijuši dominējošie genotipi pasaulē, ko apliecina ilgtermiņa HRSV molekulārās uzraudzības pētījumi [Rafiefard et al., 2004; Reiche and Schweiger, 2009; Zlateva et al., 2007]. Genotips GA5 Latvijā netika konstatēts, lai arī ir zināms, ka tas bija sastopams citās valstīs šajā laika periodā [Baek et al., 2012; Eshaghi et al., 2012; Houspie et al., 2013; Khor et al., 2013].

Visām HRSV-B sekvencēm tika konstatēta 60 nt duplikācija G gēnā, kas raksturo BA ģenētisko līniju [Trento et al., 2003]. Celmi ar šo mutāciju pirmo reizi tika aprakstīti 1999. gadā Buenosairesā (no turienes saīsinājums „BA”), lai gan vēlāka paraugu arhīvu analīze atklāja, ka apmēram pusgadu pirms tam šāda mutācija bija izolātam no Madrides Spānijā. Šī mutācija radās, genotipa GB3 vīrusa RNS polimerāzei antigenomās RNS molekulas sintēzes laikā pārlecot atpakaļ un vēlreiz transkribējot 60 nt, kas izveidoja stabilu sekundāro RNS struktūru [Trento et al., 2003]. Nākamo 3–4 gadu laikā šādi celmi tika konstatēti visos kontinentos [Trento et al., 2010]. Kopš 2005. gada BA-IV ir visbiežāk

izolētais HRSV-B genotips pasaulē, kas lielā mērā aizstājis visas pārējās HRSV-B ģenētiskās līnijas [Agrawal et al., 2009; Houspie et al., 2013; van Niekerk and Venter, 2011; Trento et al., 2010]. Šī genotipa parādīšanās sakrīt ar BA vīrusu ātrās izplešanās fāzi, kad to populācijas izmēram bija novērojams eksponenciāls pieaugums [Trento et al., 2010]. Ir aprakstītas arī vairākas BA-IV apakšlīnijas [Dapat et al., 2010], bet to iekļaušana molekulārajā analīzē nedeva konsekvēntus rezultātus.

2012. gadā, nākamajā sezonā pēc sākotnējā apraksta, tika izolēts cits HRSV-A genotips – ON1. Genotipam ON1 raksturīga 72 nt duplikācija G gēnā 3' daļā. Šis celms parādījās Kanādā 2010./2011. sezonā, kad tas sastādīja 10% no visiem HRSV-A izolātiem [Eshaghi et al., 2012]. Līdzīga izplatība tika novērota arī nākamajā sezonā Vācijā (10%) [Prifert et al., 2013], 2012./2013. sezonas sākumā Ķīnā (30%) [Cui et al., 2013] un 2012./2013. sezonā Japānā (13,4%) [Tsukagoshi et al., 2013]. 2011./2012. sezonā šajā pētījumā tika detektēti tikai desmit HRSV-A vīrusi, no kuriem divi (20%) bija ON1.

Atšķirībā no lielākās daļas proteīnu, HRSV G proteīns vairāk atšķīrās aa nekā nt līmenī, kas apstiprina iepriekšējus novērojumus [Cane, 1997; Johnson et al., 1987; Venter et al., 2001]. Tas vēlreiz apstiprina šī proteīna strukturālo plasticitāti un spēju panest aa substitūcijas. Starp Latvijas izolātiem tika novērots būtisks G proteīna garuma polimorfisms – no 297 līdz 321 aa (skat. 3.9. attēlu). To ietekmēja sekojoši faktori: (i) visiem NA1 celmiem bija priekšlaicīgs terminācijas kodons un to paredzamā G proteīna sekvenca bija 297 aa; (ii) vienīgajam ON1 celmam bija 321 aa gara G proteīna sekvenca 24 aa insercijas dēļ; (iii) BA-IV celmiem paredzamie G proteīna garumi bija 310 un 317 aa alternatīvu terminācijas kodonu izmantošanas dēļ. HRSV-B celmiem ir aprakstīta dažādu atgriezenisku terminācijas kodonu izmantošana, ieskaitot *Stop313→Q* [Botosso et al., 2009]. Kopā ar „rāmja” insercijām un delēcijām (kā piemēram, *P159–K160*, kas tika novērota visos Latvijas izolātos) BA ģenētiskajām līnijām ir vismaz 13 dažādi proteīna garumi [Houspie et al., 2013; Trento et al., 2010; Zlateva et al., 2007]. Pēdējos gados ir dominējuši izolāti ar 310 aa G proteīnu [Houspie et al., 2013], un, iespējams, pētījuma izskaņā detektētajiem 371 aa garajiem celmiem atgriežas selektīvas priekšrocības. *In vitro* G proteīna izmēra redukcija ar „rāmja” priekšlaicīgiem terminācijas kodoniem ļauj vīrusam izvairīties no neitralizācijas ar monoklonālajām antivielām, neizmainot tā infekciozitāti [Rueda et al., 1991].

Glikozilācija ir būtisks HRSV antigenitātes faktors, jo tā var gan nomākt, gan pastiprināt antivielu afinitāti [Botosso et al., 2009]. Celmu specifiskās monoklonālās antivielas reaģē tikai ar glikozilētu G proteīnu [Martinez et al., 1997], tāpēc celmu raksturojums bez glikozilācijas īpašībām ir nepilnīgs. Šajā pētījumā proteīnu glikozilācija tika prognozēta, izmantojot neirālā tīkla prognozes. Mutācijas, kas radīja tiešu glikozilācijas receptoru nomaiņu vai samazināja to glikozilācijas iespējamību, bija bieži sastopamas, tādējādi palielinot celmu fenotipisko dažādību. Tomēr, neskatoties uz G proteīna dažādību un garuma polimorfismu, kopējā prolīna/serīna/treonīna proporcija bija stabila (aptuveni 10, 10 un 25%), saglabājot mucīnam līdzīgās īpašības [Julenius et al., 2005]. Mucīnam līdzīgie reģioni ir negatīvas RNS saturošo vīrusu bieži izmantots patogenitātes faktors, kuriem raksturīga īpaši ātra evolūcija, saglabājot to funkciju un patogenitāti. Pastāv divas hipotēzes, kas šo fenomenu izskaidro: (i) spēcīgs pozitīvās selekcijas spiediens un (ii) attīrošās selekcijas trūkums [Wertheim and Worobey, 2009]. Iepriekš veiktos pētījumos imunoloģiskās atbildes radīts selekcijas spiediens ir atrasts kā viens no būtiskiem faktoriem, kas virza HRSV ģenētisko mainību [Cane and Pringle, 1995], tādēļ tika veikta arī padziļināta dabīgās atlases analīze. Lai arī kopējā dN/dS attiecība NA1 celmiem bija >1 , kas liecina par evolucionāru selekciju, tikai divas pozīcijas atradās zem pozitīvas selekcijas spiediena. Abas šīs vietas ir iesaistītas celma A2 B un T šūnu epitopos [Cane, 1997; Hancock et al., 2003; Norrby et al., 1987] (4.3. attēls).

4.3. att. Celma A2 B un T šūnu epitopu karte

Karte veidota pēc Imūno epitopu datubāzes meklēšanas rezultātiem (<http://www.iedb.org/>). Augšējā diagramma shematiski attēlo celma A2 G proteīna aminoskābju pozīcijas no 187–298. Īpaši atzīmētas Latvijas HRSV-A celmu pozitīvās selekcijas vietas un reģions Q261–S283 (skat. tekstā). B šūnu epitopi norādīti zilā krāsā, T šūnu epitopi – oranžā. Cipari norāda epitopu datubāzes identifikācijas numurus.

Šī atradne nav konsekventa dažādos pētījumos, piemēram, M262 un N273 tika arī prognozēti [Eshaghi et al., 2012; Houspie et al., 2013; Kushibuchi et al., 2013; Yoshida et al., 2012; Zlateva et al., 2004], bet netika apstiprināti [Botosso et al., 2009; Tan et al., 2012], lietojot līdzīgu metodoloģiju kā šajā pētījumā. BA-IV celmiem bija vērojama lielāka dažādība, ko mazāk ietekmēja pozitīvās selekcijas spiediens – kopējā dN/dS attiecība bija 0,45. Divi pozitīvi selekcionētie kodoni, L219 un T270, ir iepriekš ziņoti [Botosso et al., 2009; Kushibuchi et al., 2013; Zlateva et al., 2005], kamēr citi kodoni (142, 227, 235, 258, 259, 311), kas šajos pašos pētījumos izrādījās zem pozitīvās selekcijas spiediena, bija konservatīvi Latvijas sekvencēs (skat. 3.10. attēlu). Šāds konsekvences trūkums skaidrojams ar vairākiem faktoriem. Šajā pētījumā tika analizēts tikai viens genotips abās HRSV grupās. Citos pētījumos, kuros novērojumi veikti pat 10 un vairāk gadus, tika iekļauti citi tobrīd aktīvi cirkulējoši genotipi, kā arī jau izmirušas ģenētiskās līnijas. Šādas atšķirības varētu arī rasties celmiem adaptējoties dažādu saimnieka organismu populāciju imunitātes līmeņiem. Visbeidzot, tas var norādīt arī uz pozitīvās selekcijas trūkumu un vīrusa evolucionēšanu atslābinātas attīrošās selekcijas apstākļos, t.i. HVR2 segments, saglabājot mucīnam līdzīgās īpašības, nav pārāk ierobežots savā mainībā [Wertheim and Worobey, 2009].

4.7. HRSV celmu globālā diseminācija

Kopš sākotnējā apraksta Kanādā, ON1 celmi ir izolēti vairākās pasaules vietās gan no bērniem un veciem ļaudīm [Lee et al., 2012], gan no pacientiem ar intrahospitālu infekciju [Valley-Omar et al., 2013], kā arī ir pieejama tā pilna genoma sekvence [Lee et al., 2012]. ON1 veido atsevišķu klasteri, arī genotipējot pēc F gēna, kas apstiprina, ka tas pieder atsevišķi izdalāmai ģenētiskajai līnijai [Eshaghi et al., 2012]. Priferta ar kolēģiem konstatēja asociāciju starp šo genotipu un stacionēšanu intensīvās terapijas nodaļā [Prifert et al., 2013]. Tomēr šī asociācija pagaidām nav citur validēta. Šajā pētījumā ON1 pacientiem bija vidēji smagas dziļāko elpceļu infekcijas, un, lai arī vienam no pacientiem hipoksēmijas dēļ dažas dienas bija nepieciešama skābekļa inhalācija, viņiem nebija nepieciešama stacionēšana intensīvās terapijas nodaļā. Ešagī ar kolēģiem izvirzīja hipotēzi,

ka 72 nt duplikācija radusies, RNS polimerāzei pārlecot atpakaļ, vietā, kur atrodas 7 nt atkārtojums un sekundārās RNS struktūras cilpa [Eshaghi et al., 2012]. Tā ir šobrīd lielākā aprakstītā dabīgā insercija G gēnā. Šādas mutācijas ir retas un ir ļoti maz ticams, ka tās varētu rasties vienlaicīgi dažādās vietās neatkarīgi. Līdz ar to tās ir iespējams izmantot kā „dabīgu marķieri”, lai rekonstruētu HRSV celmu disemināciju [Trento et al., 2010]. HRSV izplatības rekonstrukcija, izmantojot stabilus genotipus kā, piemēram, GA2, ir apgrūtināta, jo to ietekmē izolēšanas laika jaucējfaktors – dažādās valstīs pētījumi tiek veikti dažādos laikos, un rodas iespaids par temporāli-ģeogrāfisku asociāciju [Katzov-Eckert et al., 2013].

Šajā pētījumā ir pirmo reizi aprēķināts ON1 evolūcija ātrums, populācijas dinamika un diskrētā filoģeogrāfiskā analīze, balstoties pasaulē izdalītajām sekvencēm laika periodā no 2010. gada decembra līdz 2013. gada jūnijam. Aprēķinātais ON1 evolūcijas ātrums HVR2 segmentā ($7,92 \times 10^{-3}$ nt/pozīcijā/gadā) bija ievērojami lielāks par iepriekš ziņotajiem aprēķiniem, balstoties uz pilna HRSV-A genoma sekvencēm ($6,47 \times 10^{-4}$) vai pilna garuma G gēna sekvencēm ($2,22 \times 10^{-3}$) [Tan et al., 2012]. Šis temps ir arī lielāks kā evolūcija citu HRSV-A un B genotipu HVR2 segmentā ($3,6\text{--}4,7 \times 10^{-3}$) [Kushibuchi et al., 2013; Tan et al., 2012], kā arī vismaz decimālo pakāpi lielāks par citu paramiksovīrusu virsmas glikoproteīnu evolūcijas ātrumiem [Mizuta et al., 2011; Saitoh et al., 2012]. Tas, iespējams, liecina par atslābinātu attīrošo selekcijas spiedienu, kas darbojas duplicētajā reģionā [Wertheim and Worobey, 2009].

ON1 demogrāfiskā vēsture līdz šim ir bijusi ievērojami savādāka kā BA genotipam, kam pēc 60 nt duplikācijas G gēnā pirmajos desmit gados bija vērojama populācijas izplešanās [Trento et al., 2010]. Lai arī efektīvās ON1 populācijas izmērs pirms 2012./2013. sezonas sākuma samazinājās, šie dati var mainīties, kad kļūs pieejamas jaunas sekvences. Iespējams, ka tāpat kā BA genotipiem, papildus duplikācijai ir nepieciešamas citas mutācijas, lai panāktu optimālu vīrusa adaptāciju replikācijai. Mehānisms, kā 20-aa insercija BA celmiem rada selektīvas priekšrocības, nav zināms. Iespējams, tā mainīja G proteīna antigēnās īpašības, ļaujot izvairīties no iepriekš esošajām neitralizējošajām antivielām cilvēku populācijā, un turpmāk novērotais antigēnais drifts vēl vairāk uzlaboja vīrusa pielāgošanos [van Niekerk and Venter, 2011; Trento et al., 2010]. Jāpiezīmē, ka, lai arī BA vīrusi ir gandrīz pilnībā aizstājuši citas HRSV-B ģenētiskās līnijas, to izraisītā slimība nav smagāka un HRSV-A un B populāciju izmēri saglabā līdzīgas proporcijas kā

pirms BA parādīšanās [Katzov-Eckert et al., 2012]. ON1 gadījumā, duplikācijas reģions satur vairākus B un T šūnu epitopus [Cane, 1997] un maina G proteīna O- un N-glikozilācijas īpašības (4.2. un 3.8. attēli). Divu gadu laikā vairāki izolētie ON1 vīrusi arī ir uzrādījuši antigēno driftu duplicētajā segmentā, kas vairs nav tieša sākotnējās sekvences kopija (4.4. attēls).

		260	270	280	290	300	310
Canada 67-1210 2011	PEHTS	QEETLHSTT	SEGYLSPSQVYTT	SG	QEETLHSTT	SEGYLSPSQVYTT	SEYLSQ
Japan 6540 2012.7			P			P	A S
Japan 6577 2012.8			V P				
Japan 6562 2012.8			V				
Italy 12221 2012.2			P		D	P	H
Italy 16223 2012.3				KP			
Italy 10162 2012.2			L				
Italy 02253 2012					Y		
Germany 14576 2012.4						P	
SouthAfrica 001 2012.2			R				K
Germany 16397 2012.4			P			P	H

4.4. att. Aminoskābju izkārtojums genotipa ON1 duplicētajam segmentam

Duplikācija norādīta ar taisnstūri. Pasaules izolātu salīdzinājums dots pret sākotnēji aprakstīto celmu ON67-1210A (GenBank pieejas kods JN257693). Iekļautas tikai sekvences, kas neatkārtojās aplūkotajā fragmentā.

Diskrētā filoģeogrāfiskā analīze uzrādīja divas galvenās ON1 transmisijas likumsakarības [Holmes et al., 2008]: (i) viļņveida izplatīšanās no Kanādas caur Itāliju uz pārējām pasaules valstīm ar noteiktu virzienu no rietumiem uz austrumiem un (ii) gravitācijas efekts, kur, domājams, sekojot cilvēku pārvietošanās maršrutiem, vīruss no „distāliem” reģioniem atkārtoti nonāca Vācijā (3.12. un 4.5. attēli).

4.5. att. Genotipa ON1 iespējamie migrācijas ceļi

Bultas norāda MCC filoģeoģenētiskā koka zarus (skat. 3.12. attēlu), kur notikušas pārejas starp lokalizācijām. Krāsainie apli ataino lokalizācijas 95% HPD robežas.

ON1 izplatības rekonstrukcijā vairākām lokalizācijas pārejām trūka statistiskā nozīmība, tomēr šo hipotēzi atbalsta vairāki papildus pierādījumi. Pirmkārt, visiem ON1 genomiem, kas pieejami GenBank, ir arī $E232 \rightarrow G$ un $T253 \rightarrow K$ mutācijas (globālo celmu izkārtojumu nesēns publicēja Cui ar kolēģiem) [Cui et al., 2013]. Kad NCBI-BLAST serverī tika meklētas ON1 proteīna sekvences ar izgrieztu duplicēto segmentu, neviens no meklēšanas rezultātiem šīs divas mutācijas nesaturēja, tomēr $E232 \rightarrow G$ bija aprakstīta vienam no Kanādas NA1 celmiem, kas tika izolēts vienā pētījumā ar ON1, kas varētu liecināt par zināmu pēctecību. Otrkārt, cits NA1 celms (LV/043/12) arī tika izolēts Kanādā un nākamajā sezonā Itālijā, Vācijā un Latvijā (3.6. tabula). Treškārt, aprēķinātais tMRCA (2010. gada augusts) labi sakrīt ar Ešagī un kolēģu prognozēm, ka šis genotips ir radies dažus mēnešus pirms 2010./2011. ziemas [Eshaghi et al., 2012]. Ceturtkārt, ticamākie vīrusa izplatšanās ceļi atbilda galvenajiem cilvēku starpkontinentālajiem pārvietošanās ceļiem. Lai arī šo argumentu nevar attiecināt uz Malaizijas-Latvijas iespējamo ON1 migrācijas ceļu un tam nebija arī statistiskā atbalsta, iepriekš ir novērota ģenētiska radniecība starp šajā pētījumā izolēto NA1 celmu LV/012/10 un celmiem no citas Okeānijas valsts – Filipīnām [Ohno et al., 2013]. Tikai vienam no šī pētījuma ON1

pacientiēm bija fiksēta ceļošanas anamnēze, un ir zināms, ka šis pacients nebija ceļojis ārpus Latvijas. Kopumā netika noraidīta darba 3. hipotēze, jo ticami tika rekonstruēta genotipa ON1 globālā izplatība.

Cukagoši ar kolēģiem ON1 tMRCA aprēķināja 2001. gadā [Tsukagoshi et al., 2013], tomēr šis laiks liekas pārāk sens, jo HRSV molekulārās uzraudzības pētījumi aktīvi norisinās vairākās pasaules valstīs, un 72 nt duplikācija pirms 2010. gada nav konstatēta. Sākotnējam ON1 izolātam no Kanādas bija precīza 72 nt duplikācija un vēlāk izdalītie izolāti uzrādīja, lai arī vāju, tomēr noteiktu ģenētiskās mainības signālu laikā (3.11. attēls) un vairs nesaglabāja precīzu duplikācijas kopiju (4.4. attēls). Iespējams, šāda atšķirība radās, jo Cukagoši noteica tMRCA starp ON1 izolātiem un NA1 references celmu NG-016-04 (izolēts 2004. gada 28. oktobrī), un rezultāts būtu savādāks, ja analizē tiktu iekļauti nesenāki NA1 celmi.

Katcova-Ekerta ar kolēģiem rekonstruēja vairāku citu populāru genotipu disemināciju pasaulē [Katzov-Eckert et al., 2013]. Pēc autores datiem genotips GA2 sākotnēji parādījās Okeānijā un ar augstu ticamību pēc tam izplatījās uz Eiropu un Dienvidameriku, turklāt Eiropa kalpoja kā „gravitācijas” centrs, no kura šis genotips izplatījās uz pārējām pasaules daļām. Arī genotips GA5, lai arī tā izcelsmes reģions nav zināms, galvenokārt ceļoja uz un no Eiropas. BA apakšgrupa izcēlās no Dienvidamerikas, no kurienes tā izplatījās uz Eiropu un turpināja aktīvi migrēt starp Ziemeļameriku un Dienvidameriku, savukārt Eiropa atkal bija starpposms izplatībai uz pārējo pasauli.

4.8. Pētījuma datu interpretācijas ierobežojumi

Šim pētījumam ir vairāki ierobežojumi, kas liek piesardzīgi vērtēt gan tā klīniskos, gan molekulāros rezultātus. Pirmkārt, nebija iespējams validēt pielietoto diagnostikas metodi ar virusoloģijas zelta standartu – šūnu kultūru, tās dārdzības dēļ. Otrkārt, pacientu iesaiste pētījumā bija atkarīga no pētnieku pieejamības (kopā pacientu iesaistē piedalījās četri pētnieki, caurmērā, sezonas laikā pieejami bija divi), kas lielā mērā bija ierobežota ar darbadienām, t.i. nebija pilnībā sistematizēta. Treškārt, lai arī BKUS ir terciārā līmeņa slimnīca, ir skaidrs, ka lielākā pacientu daļa atbilda sekundārajam līmenim, turklāt daļa

Rīgas pacientu nonāca BKUS citā novietnē – „Gaiļezers”. 13,4% pacientu kā dzīvesvietu atzīmēja lauku teritoriju, bet reģions sīkāk netika izdalīts. Līdz ar to nevar precīzi aprēķināt, kāda Latvijas bērnu populācijas daļa tika pētījumā iekļauta, un nav iespējams aprēķināt populācijas mēroga datus. Neskatoties uz šiem trūkumiem, sezonalitātes datus varēja labi validēt ar SPKC pieejamo informāciju, un pētījums saglabā savu nozīmi kā viena terciāra līmeņa slimnīcas datu analīze.

Molekulāro datu interpretāciju ierobežo to informātiskais raksturs. Lai arī veiksmīgi tika sekvenēti pilnīgi visi HRSV pozitīvie paraugi (kas bieži ir bijis apgrūtinājums līdzīgos pētījumos citur, skat. 4.1. tabulu), proteīnu analīze (glikozilācija, pozitīvās selekcijas vietas u.c.) tika balstīta uz matemātiskiem aprēķiniem, nevis tiešiem proteomikas vai imunoloģiskiem datiem. Genotipa ON1 filodinamiskie un filoģeogrāfiskie aprēķini balstījās uz molekulārā pulksteņa hipotēzi. Lai arī bija statistiski nozīmīga tās klātbūtne, tā tikai daļēji ($R^2=0,21$) izskaidroja ģenētiskās atšķirības starp izolātiem (3.10. attēls). RNS vīrusu evolūciju limitē arī strukturāli ierobežojumi kā, piemēram, sekundārā RNS struktūra, kas pārkāpj molekulārā pulksteņa pieņēmumu [Simmonds and Smith, 1999]. Šie faktori tika kompensēti, aprēķinos lietojot atslābināta molekulārā pulksteņa modeļa parametru, kas pieļauj nt substitūciju biežumu variācijas starp ģenētiskajām līnijām.

5. SECINĀJUMI

1. Pētījuma vajadzībām tika izstrādāta oriģināla HRSV PCR diagnostikas metode, kas ļāva izšķirt arī galvenās grupas HRSV-A un B un, salīdzinot ar IFA testu, uzrādīja 95,2% jutību un 91,2% specifiskumu.
2. Ar dziļāko elpceļu infekcijām stacionētiem bērniem vecumā no 2–24 mēnešiem HRSV bija ierosinātājs 42,5% gadījumu.
3. HRSV sezonālā aktivitāte tika noteikta no 51. līdz 19. gada nedēļai.
4. Pētījumā netika noteikta saistība starp HRSV ģenētisko grupu A un B vai atsevišķu genotipu un to izraisīto infekciju klīnisko smagumu (noraidīta darba 2. hipotēze).
5. Pētījumā tika detektēti vairāki gan iepriekš citur izolēti, gan Latvijai unikāli HRSV celmi, kuru molekulārā epidemioloģija kopumā atbilda globālajām cirkulācijas tendencēm (netika noraidīta darba 1. hipotēze). Glikoproteīna G mainību varēja tikai daļēji izskaidrot ar saimniekorganisma imunoloģiskās sistēmas radītu selekcijas spiedienu.
6. Pielietojot molekulārā pulksteņa principu Baijesa evolucionārajā analīzē, ticami tika rekonstruēta genotipa ON1 globālā izplatība un populācijas dinamika (netika noraidīta darba 3. hipotēze).

6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Ņemot vērā biežo izplatību stacionētiem bērniem ar dziļāko elpceļu infekciju tā sezonas laikā, optimālai pacientu kohortēšanai būtu vēlams ieviest HRSV ātrās diagnostikas testu terciārā līmeņa bērnu slimnīcā. Tas, iespējams, ļautu ietaupīt arī HRSV infekciju ārstēšanā nepieciešamos resursus.
2. Valsts specifiskās imūnprofilakses stratēģijas veidošanā būtu jāņem vērā, ka Latvijā HRSV sezonālā aktivitāte sākas un beidzas vēlāk kā citās Ziemeļu puslodes valstīs un šo valstu rekomendācijas var nederēt Latvijas apstākļiem.

7. AUTORA PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI

7.1. Publikācijas

1. Balmaks R, Ribakova I, Gardovska D, Kazaks A. 2013. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus over three consecutive seasons in Latvia. Journal of Medical Virology doi:10.1002/jmv.23855.
2. Balmaks R, Ribakova I, Gardovska D, Kazaks A. 2013. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus during the 2009–2010 season in Latvia. Archives of Virology 158(5):1089-1092.
3. Eihvalde L, Ansone S, Balmaks R, Ribakova I, Kazāks A, Grope I, Kozlovskā L, Livdāne J, Gardovska D. 2012. Viral lower respiratory tract infections in children under 2 years of age in the winter season of 2010/2011 in Children's University Hospital, Riga (Latvia). Lietuvos Bendrosios Praktikos Gydytojas 16(9):612-617.
4. Balmaks R, Kazaks A, Likopa Z, Grope I, Rasnacs O, Gardovska D. 2011. A new tool for molecular monitoring of respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections. Riga Stradins University Collection of Scientific Papers 2010:100-105.

7.2. Ziņojumi kongresos un konferencēs

1. Balmaks R, Ribakova I, Grope I, Gardovska D, Kazāks A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over three consecutive seasons in Latvia. 31st Annual Meeting of the European Society For Paediatric Infectious diseases. Milāna, Itālija, 2013.
2. Ribakova I, Balmaks R, Grope I, Gardovska D, Kazāks A. Respiratorā sincitiālā vīrusa molekulārā epidemioloģija triju sekojošu sezonu laikā. Rīgas Stradiņa universitātes Zinātniskā konference, 2013.
3. Ribakova I, Grope I, Balmaks R, Kazāks A, Gardovska D. Apgrieztās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas lietojums respiratori sincitiālā vīrusa diagnostikai Bērnu

- klīniskajā universitātes slimnīcā. Rīgas Stradiņa universitātes Zinātniskā konference, 2012.
4. Balmaks R, Kazaks A, Ribakova I, Rasnacs O, Grope I, Gardovska D. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus during 2009/2010 season in Latvia. 29th Annual Meeting of the European Society For Paediatric Infectious diseases. Hāga, Nīderlande, 2011.
 5. Balmaks R, Freivalds J, Gardvoska D, Kazaks A. Molecular monitoring and yeast expression of respiratory syncytial virus structural genes from clinical samples in Latvia during 2009/10 season. Viruses and Cells Gordon Research Conference. Barga, Itālija, 2011.
 6. Balmaks R, Kazāks A, Ribakova I, Grope I, Gardovska D. Respiratori sincitiālā vīrusa apakšgrupu raksturojums Bērnu klīniskajā universitātes slimnīcā 2009./2010. gada epidēmiskajā sezonā. Rīgas Stradiņa universitātes Zinātniskā konference, 2011.
 7. Balmaks R, Kazaks A, Ribakova I, Grope I, Gardovska D. Circulation of group A and B respiratory syncytial virus in Latvia. 1st Baltic Paediatric Congress. Viļņa, Lietuva, 2011.
 8. Balmaks R, Likopa Z, Grope I, Gardovska D, Kazaks A. Development of a novel PCR diagnostic assay of respiratory syncytial virus in young children with severe disease. 28th Annual Meeting of the European Society For Paediatric Infectious diseases. Nica, Francija, 2010.
 9. Balmaks R, Kazāks A, Ribakova I, Grope I, Gardovska D. Respirato sincitiālā vīrusa apakšgrupu raksturojums bērnu klīniskajā universitātes slimnīcā 2009./2010. gada epidēmiskajā sezonā. Rīgas Stradiņa universitātes 9. zinātniskā konference, 2010.
 10. Balmaks R, Līkopa Z, Grope I, Gardovska D, Kazāks A. Jauna respiratori sincitiālā vīrusa genotipēšanas metode bērniem ar dziļo elpceļu infekciju. Rīgas Stradiņa universitātes 9. zinātniskā konference, 2010.
 11. Līkopa Z, Balmaks R, Celmiņa Dz, Rasnačs O, Grope I, Gardovska D. Respiratori sincitiālā vīrusa (RSV) infekcijas epidemioloģiskās un klīniskās īpatnības Bērnu KUS ārstētiem bērniem. Rīgas Stradiņa universitātes 9. zinātniskā konference, 2010.

8. PATEICĪBAS

Vislielākā pateicība maniem darba vadītājiem un skolotājiem Dacei Gardovskai un Andrim Kazākam. Bez Profesores šis darbs nekad nebūtu uzsākts un bez Kazāka novests līdz galam.

Tāpat šis darbs nekādi nebūtu iespējams bez VSIA BKUS 9., bijušās 7. nodaļas un Mikrobioloģijas laboratorijas personālu atsaucības. Personīgas pateicības arī Irinai Ribakovai par lielu palīdzību visos pētījuma posmos, Zanei Līkopai un Lotai Ozolai par pacientu iesaisti pētījumā, doc. Renāram Ertam un Oskaram Rasnačam (abi RSU) par palīdzību biostatistikā, doc. Jānim Januševskim (Rīgas Tehniskā universitāte) par konsultācijām Baijesa teorēmā, Jēkabam Januševskim un Annai Jaunbergai par palīdzību grafiskajā noformējumā. Paldies prof. Gregorijam Storčam (Vašingtona Universitātes Medicīnas skola, Sentluisa, ASV) par ieteikumiem un kritiku. Kā arī Ievai Lībieteī, kura ar molekulāro bioloģiju ir saistīta tikai piespiedu kārtā, un pārējai manai ģimenei, kas ar to nav saistīta nekādā veidā, bet izrādīja sapratni un iecietību.

9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Adams JM. 1941. Primary virus pneumonitis with cytoplasmic inclusion bodies: Study of an epidemic involving thirty-two infants, with nine deaths. *JAMA* 116(10):925-933.
2. Agoti CN, Gitahi CW, Medley GF, Cane PA, Nokes DJ. 2013. Identification of group B respiratory syncytial viruses that lack the 60-nucleotide duplication after six consecutive epidemics of total BA dominance at coastal Kenya. *Influenza and Other Respiratory Viruses* Epub: June 20, 2013. doi: 10.1111/irv.12131.
3. Agrawal AS, Sarkar M, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Chakraborty N, Basak M, Naik TN. 2009. Prevalence of respiratory syncytial virus group B genotype BA-IV strains among children with acute respiratory tract infection in Kolkata, Eastern India. *Journal of Clinical Virology* 45(4):358-361.
4. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. 2009. Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 124(6):1694-1701.
5. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. 2006. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 118(4):1774-1793.
6. Amirav I, Luder AS, Kruger N, Borovitch Y, Babai I, Miron D, Zuker M, Tal G, Mandelberg A. 2008. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of montelukast for acute bronchiolitis. *Pediatrics* 122(6):e1249-e1255.
7. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. 2013. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine* 31, Supplement 2(0):B209-B215.
8. Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. 1998. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics* 101(4):617-619.
9. Ater D, Shai H, Bar B-E, Fireman N, Tasher D, Dalal I, Ballin A, Mandelberg A. 2012. Hypertonic saline and acute wheezing in preschool children. *Pediatrics* 129(6):e1397-e1403.
10. Baek Y, Choi E, Song M-S, Pascua P, Kwon H-i, Park S-J, Lee J, Woo S-I, Ahn B-H, Han H-S, Hahn Y-S, Shin K-S, Jang H-L, Kim S-Y, Choi Y-K. 2012. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Archives of Virology* 157(6):1039-1050.
11. Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. 2011. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* 27(20):2910-2912.
12. Black CP. 2003. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respiratory Care* 48(3):209-233.
13. Bloemers BLP, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJB, Broers CJM, van den Ende K, Kimpen JLL, Strengers JLM, Bont LJ. 2007. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis— a prospective birth-cohort study. *Pediatrics* 120(4):e1076-e1081.
14. Bloom-Feshbach K, Alonso WJ, Charu V, Tamerius J, Simonsen L, Miller MA, Viboud C. 2013. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review. *PLoS ONE* 8(2):e54445.

15. Botosso VF, Zanotto PMdA, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TCT, Jamal LF, Pardini MIDMC, Pinho JRR, Massad E, Sant'Anna OA, Holmes EC, Durigon EL, and the VC. 2009. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog* 5(1):e1000254.
16. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss H-P, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. 2003. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *Journal of the American College of Cardiology* 42(3):466-472.
17. Brandenburg AH, Groen J, Steensel-Moll HAv, Claas ECJ, Rothbarth PH, Neijens HJ, Osterhaus ADME. 1997. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *Journal of Medical Virology* 52(1):97-104.
18. Cane PA. 1997. Analysis of linear epitopes recognised by the primary human antibody response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *Journal of Medical Virology* 51(4):297-304.
19. Cane PA. 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in Medical Virology* 11(2):103-116.
20. Cane PA, Pringle CR. 1995. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *Journal of Virology* 69(5):2918-2925.
21. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. 2012. The evolution of HIV: Inferences using phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62(2):777-792.
22. Chanock R, Finberg L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *American Journal of Epidemiology* 66(3):291-300.
23. Chemaly RF, Torres HA, Munsell MF, Shah DP, Rathod DB, Bodey GP, Hosing C, Saifan C, Raad II, Champlin RE. 2012. An adaptive randomized trial of an intermittent dosing schedule of aerosolized ribavirin in patients with cancer and respiratory syncytial virus infection. *Journal of Infectious Diseases* 206(9):1367-1371.
24. Chowdhury MM, McKenzie SA, Pearson CC, Carr S, Pao C, Shah AR, Reus E, Eliahoo J, Gordon F, Bland H, Habibi P. 2013. Heliox therapy in bronchiolitis: phase III multicenter double-blind randomized controlled trial. *Pediatrics* 131(4):661-669.
25. Collins P, Crowe J. 2007. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 1602-1646.
26. Collins PL, Graham BS. 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Virology* 82(5):2040-2055.
27. Collins PL, Melero JA. 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years. *Virus Research* 162(1-2):80-99.
28. Connors M, Collins PL, Firestone CY, Murphy BR. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *Journal of Virology* 65(3):1634-1637.

29. Cui G, Qian Y, Zhu R, Deng J, Zhao L, Sun Y, Wang F. 2013. Emerging human respiratory syncytial virus genotype ON1 found in infants with pneumonia in Beijing, China. *Emerging Microbes and Infections* 2(4):e22.
30. Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H, Dapat C, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. 2010. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9):3423-3427.
31. Delpont W, Poon AFY, Frost SDW, Kosakovsky Pond SL. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26(19):2455-2457.
32. Drummond A, Pybus O, Rambaut A. 2003. Inference of viral evolutionary rates from molecular sequences. *Advances in Parasitology* 54:331-358.
33. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(5):1185-1192.
34. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8):1969-1973.
35. Enriquez A, Chu IW, Mellis C, Lin W-Y. 2012. Nebulised deoxyribonuclease for viral bronchiolitis in children younger than 24 months. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11:CD008395.
36. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB. 2012. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS ONE* 7(3):e32807.
37. Etemadi M, Sekawi Z, Othman N, Lye M, Moghaddam F. 2013. Circulation of human respiratory syncytial virus strains among hospitalized children with acute lower respiratory infection in Malaysia. *Evolutionary Bioinformatics Online* 9:151-161
38. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *New England Journal of Medicine* 352(17):1749-1759.
39. Falsey AR, Walsh EE. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews* 13(3):371-384.
40. Feinstein AR. 2002. *Principles of medical statistics*. London: Chapman & Hall/CRC. 703 p.
41. Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, Piazza FM, Carlin DA, Top FH, Connor EM, Sondheimer HM, for the Cardiac Synagis Study G. 2003. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *The Journal of Pediatrics* 143(4):532-540.
42. Fernandes R, Bialy L, Vandermeer B, Tjosvold L, Plint A, Patel H, Johnson D, Klassen T, Hartling L. 2010. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 6(10):CD004878.
43. Fischer Langley G, McCracken J, Arvelo W, Estevez A, Villarruel G, Prill M, Iwane M, Gray J, Moscoso F, Reyes L, Moir JC, Ortiz J, Lindblade K. 2013. The epidemiology and clinical characteristics of young children hospitalized with respiratory syncytial virus infections in Guatemala (2007–2010). *The Pediatric Infectious Disease Journal* 32(6):629-635.

44. Fleming DM, Pannell RS, Elliot AJ, Cross KW. 2005. Respiratory illness associated with influenza and respiratory syncytial virus infection. *Archives of Disease in Childhood* 90(7):741-746.
45. Frost SDW, Volz EM. 2010. Viral phylodynamics and the search for an 'effective number of infections'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1548):1879-1890.
46. Gadomski A, Brower M. 2010. Bronchodilators for bronchiolitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 8(12):CD001266
47. García CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, Mejias A. 2010. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics* 126(6):e1453-e1460.
48. Gaunt ER, Jansen RR, Poovorawan Y, Templeton KE, Toms GL, Simmonds P. 2011. Molecular epidemiology and evolution of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *PLoS ONE* 6(3):e17427.
49. Geis S, Prifert C, Weissbrich B, Lehnert N, Egerer G, Eisenbach C, Buchholz U, Aichinger E, Dreger P, Neben K, Burkhardt U, Ho AD, Kräusslich H-G, Heeg K, Schnitzler P. 2013. Molecular characterization of a respiratory syncytial virus outbreak in a hematology unit in Heidelberg, Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 51(1):155-162.
50. Gilbert LL, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. 1996. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. *Journal of Clinical Microbiology* 34(1):140-143.
51. Glezen W, Taber L, Frank A, Kasel J. 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American Journal of Diseases of Children* 140(6):543-546.
52. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, Sepsis MotICCoP. 2005. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine* 6(1):2-8.
53. Guerguerian A-M, Gauthier M, Lebel M, Farrell C, Lacroix J. 1999. Ribavirin in ventilated respiratory syncytial virus bronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160(3):829-834.
54. Gupta R, Jung E, Brunak S. 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
55. Hall CB. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the "Cold War" has not ended. *Clinical Infectious Diseases* 31(2):590-596.
56. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. 1990. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *Journal of Infectious Diseases* 162(6):1283-1290.
57. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P. 2009. The burden of respiratory syncytial virus Infection in young children. *New England Journal of Medicine* 360(6):588-598.
58. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
59. Hancock GE, Tebbey PW, Scheuer CA, Pryharski KS, Heers KM, LaPierre NA. 2003. Immune responses to the nonglycosylated ectodomain of respiratory syncytial virus

- attachment glycoprotein mediate pulmonary eosinophilia in inbred strains of mice with different MHC haplotypes. *Journal of Medical Virology* 70(2):301-308.
60. Hart GW. 1992. Glycosylation. *Current Opinion in Cell Biology* 4(6):1017-1023.
 61. Hartling L, Fernandes RM, Bialy L, Milne A, Johnson D, Plint A, Klassen TP, Vandermeer B. 2011. Steroids and bronchodilators for acute bronchiolitis in the first two years of life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 342.
 62. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2):160-174.
 63. Heikkinen T, Ruuskanen O. 1995. Signs and symptoms predicting acute otitis media. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 149(1):26-29.
 64. Heikkinen T, Thint M, Chonmaitree T. 1999. Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *New England Journal of Medicine* 340(4):260-264.
 65. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Denny FW. 1979. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. *New England Journal of Medicine* 300(10):530-534.
 66. Henrickson KJ, Hall CB. 2007. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 26(11):S36-S40.
 67. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. 2004. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 23(1):S11-S18.
 68. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussing LM, Lebowitz MD. 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *American Journal of Epidemiology* 133(11):1135-1151.
 69. Holmes E. 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annual Review of Microbiology* 62:307-328.
 70. Hornsleth A, Klug B, Nir M, Johansen J, Hansen K, Christensen L, Larsen LB. 1998. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 17(12):1114-1121.
 71. Houspie L, Lemey P, Keyaerts E, Reijmen E, Vergote V, Vankeerberghen A, Vaeyens F, De Beenhouwer H, van Ranst M. 2013. Circulation of HRSV in Belgium: from multiple genotype circulation to prolonged circulation of predominant genotypes. *PLoS ONE* 8(4):e60416.
 72. Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, Veronessi I, Cociglio R, Zerbini E, Carballal G. 2000. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *Journal of Medical Virology* 61(1):76-80.
 73. Jafri HS, Wu X, Makari D, Henrickson KJ. 2013. Distribution of respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract Infection or apnea. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 32(4):335-340.
 74. Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ. 2013. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatric respiratory reviews* 14(1):38-45.

75. Jat KR, Chawla D. 2012. Surfactant therapy for bronchiolitis in critically ill infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 9:CD009194
76. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. 2007. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Modern Pathology* 20(1):108-119.
77. Johnson LW, Robles J, Hudgins A, Osburn S, Martin D, Thompson A. 2013. Management of bronchiolitis in the emergency department: impact of evidence-based guidelines? *Pediatrics* 131(Supplement 1):S103-S109.
78. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(16):5625-5629.
79. Johnson S, Oliver C, Prince G, Hemming V, Pfarr D, Wang S, Dormitzer M, O'Grady J, Koenig S, Tamura J, Woods R, Bansal G, Couchenour D, Tsao E, Hall W, Young J. 1997. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *The Journal of Infectious Diseases* 176(5):1215-1224.
80. Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15(2):153-164.
81. Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, Sidhu MS. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25):13961-13966.
82. Katzov-Eckert H, Botosso V, Neto E, Zanotto P, VGND consortium. 2012. Phylodynamics and dispersal of HRSV entails its permanence in the general population in between yearly outbreaks in children. *PLoS One* 7(10):e41953.
83. Khor C-S, Sam IC, Hooi P-S, Chan Y-F. 2013. Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011. *Infection, Genetics and Evolution* 14(0):357-360.
84. Kneyber M, Brandenburg A, Rothbarth P, de Groot R, Ott A, van Steensel-Moll H. 1996. Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype. *Archives of Disease in Childhood* 75(2):137-140.
85. Kneyber MCJ, van Woensel JBM, Uijtendaal E, Uiterwaal CSPM, Kimpen JLL. 2008. Azithromycin does not improve disease course in hospitalized infants with respiratory syncytial virus (RSV) lower respiratory tract disease: A randomized equivalence trial. *Pediatric Pulmonology* 43(2):142-149.
86. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution* 22(5):1208-1222.
87. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Grossman Z, Gravenor MB, Richman DD, Brown AJL. 2006. Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. *PLoS Computational Biology* 2(6):e62.
88. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Muse SV. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21(5):676-679.

89. Krilov LR. 2011. Respiratory syncytial virus disease: update on treatment and prevention. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9(1):27-32.
90. Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. 2013. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008–2011. *Infection, Genetics and Evolution* 18(0):168-173.
91. Lagos R, DeVincenzo JP, Muñoz A, Hultquist M, Suzich J, Connor EM, Losonsky GA. 2009. Safety and antiviral activity of motavizumab, a respiratory syncytial virus (RSV)–specific humanized monoclonal antibody, when administered to RSV-infected children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 28(9):835-837.
92. Lam TT, Hon CC, Tang JW. 2010. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* 47(1):5-49.
93. Langley J, Smith M, LeBlanc J, Joudrey H, Ojah C, Pianosi P. 2005. Racemic epinephrine compared to salbutamol in hospitalized young children with bronchiolitis; a randomized controlled clinical trial [ISRCTN46561076]. *BMC Pediatrics* 5(1):1-7.
94. Langley JM, LeBlanc JC, Wang EEL, Law BJ, MacDonald NE, Mitchell I, Stephens D, McDonald J, Boucher FD, Dobson S. 1997. Nosocomial respiratory syncytial virus infection in Canadian pediatric hospitals: A Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada study. *Pediatrics* 100(6):943-946.
95. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
96. Leader S, Kohlhasse K. 2003. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *The Journal of Pediatrics* 143(5):127-132.
97. Lee W-J, Kim Y-j, Kim D-W, Lee HS, Lee HY, Kim K. 2012. Complete genome sequence of human respiratory syncytial virus genotype A with a 72-nucleotide duplication in the attachment protein G gene. *Journal of Virology* 86(24):13810-13811.
98. Lemey P, Rambaut A, Drummond A, Suchard MA. 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology* 5(9):e1000520.
99. Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451-1452.
100. Liljeroos L, Krzyzaniak MA, Helenius A, Butcher SJ. 2013. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(27):11133-11138.
101. Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. 2001. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 39(8):2779-2783.
102. Lowell DI, Lister G, Von Koss H, McCarthy P. 1987. Wheezing in infants: the response to epinephrine. *Pediatrics* 79(6):939-945.
103. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak AB, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D,

- Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope III CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380(9859):2095-2128.
104. Macfarlane P, Denham J, Assous J, Hughes C. 2005. RSV testing in bronchiolitis: which nasal sampling method is best? *Archives of Disease in Childhood* 90(6):634-635.
 105. Mahony JB. 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4):716-747.
 106. Malley R, DeVincenzo J, Ramilo O, Dennehy PH, Meissner HC, Gruber WC, Sanchez PJ, Jafri H, Balsley J, Carlin D, Buckingham S, Vernacchio L, Ambrosino DM. 1998. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *Journal of Infectious Diseases* 178(6):1555-1561.
 107. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. 2002. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *Journal of Infectious Diseases* 186(6):839-842.
 108. Martinez I, Dopazo J, Melero JA. 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *Journal of General Virology* 78(10):2419-2429.
 109. McIntosh E, De Silva L, Oates R. 1993. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sydney, Australia. *Pediatric Infectious Disease Journal* 12(10):815-819.

110. Meijboom MJ, Rozenbaum MH, Benedictus A, Luytjes W, Kneyber MCJ, Wilschut JC, Hak E, Postma MJ. 2012. Cost-effectiveness of potential infant vaccination against respiratory syncytial virus infection in The Netherlands. *Vaccine* 30(31):4691-4700.
111. Melero JA. 2007. Molecular biology of human respiratory syncytial virus. In: Cane PA, editor. *Respiratory syncytial virus*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. p 1-42.
112. Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. 2011. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology Journal* 8(1):533.
113. Mlinaric-Galinovic G, Tabain I, Kukovec T, Vojnovic G, Bozikov J, Bogovic-Cepin J, Ivkovic-Jurekovic I, Knezovic I, Tesovic G, Welliver RC. 2012. Analysis of biennial outbreak pattern of respiratory syncytial virus according to subtype (A and B) in the Zagreb region. *Pediatrics International* 54(3):331-335.
114. Morris JA, Blount RE, Savage RE. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Experimental Biology and Medicine* 92(3):544-549.
115. Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 66(10):2111-2124.
116. Mullins JA, Lamonte AC, Bresee JS, Anderson LJ. 2003. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22(10):857-863.
117. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genetics* 8(7):e1002764.
118. Nadal D, Wunderli W, Meurmann O, Briner J, Hirsig J. 1990. Isolation of respiratory syncytial virus from liver tissue and extrahepatic biliary atresia material. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 22(1):91-93.
119. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simões EAF, Rudan I, Weber MW, Campbell H. 2010. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 375(9725):1545-1555.
120. Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, Feikin DR, Mackenzie GA, Moïsi JC, Roca A, Baggett HC, Zaman SMA, Singleton RJ, Lucero MG, Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AW, Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, El Arifeen S, Weber MW, Scott JAG, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H. 2013. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 381(9875):1380-1390.
121. Nielsen HE, Siersma V, Andersen S, Gahrn-Hansen B, Mordhorst CH, Nørgaard-Pedersen B, Røder B, Sørensen TL, Temme R, Vestergaard BF. 2003. Respiratory syncytial virus infection—risk factors for hospital admission: a case-control study. *Acta Paediatrica* 92(11):1314-1321.

- 122.Nikiforova R, Kantsone I. 2011. Pārskats par akūtu augšējo elpceļu infekciju (AAEI) un gripas izplatību 2011. gada 20.nedēļā Latvijā. *Epidemioloģijas biļetens* 28(1199):1-8.
- 123.Nikiforova R, Lucenko I, Zamjatina N. 2011. Pārskats par saslimstību ar akūtām augšējo elpceļu infekcijām (AAEI) un gripu 2010. - 2011. gada epidēmiskajā sezonā. *Epidemioloģijas biļetens* 34(1205):1-21.
- 124.Nikiforova R, Perevoščikovs J, Lucenko I. 2010. Pārskats par saslimstību ar akūtām augšējo elpceļu infekcijām (AAEI) un gripu 2009. - 2010. gada epidēmiskajā sezonā. *Epidemioloģijas biļetens* 31(1152):1-22.
- 125.Nikiforova R, Pulmane K. 2012. Pārskats par akūtu augšējo elpceļu infekciju (AAEI) un gripas izplatību 2012. gada 20.nedēļā Latvijā. *Epidemioloģijas biļetens* 29(1251):1-11.
- 126.Nikiforova R, Pulmane K. 2013. Pārskats par akūto augšējo elpceļu infekciju (AAEI) un gripas izplatību 2013. gada 20.nedēļā Latvijā. *Epidemioloģijas biļetens* 30(1301):1-11.
- 127.Norrby E, Mufson MA, Alexander H, Houghten RA, Lerner RA. 1987. Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G of respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(18):6572-6576.
- 128.O'Donnell DR, McGarvey MJ, Tully JM, Balfour-Lynn IM, Openshaw PJM. 1998. Respiratory syncytial virus RNA in cells from the peripheral blood during acute infection. *The Journal of Pediatrics* 133(2):272-274.
- 129.Ohno A, Suzuki A, Lupisan S, Galang H, Sombrero L, Aniceto R, Okamoto M, Saito M, Fuji N, Otomaru H, Roy CN, Yamamoto D, Tamaki R, Olveda R, Oshitani H. 2013. Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012. *Journal of Clinical Virology* 57(1):59-65.
- 130.Palomo C, García-Barreno B, Peñas C, Melero JA. 1991. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *Journal of General Virology* 72(3):669-675.
- 131.Panozzo CA, Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ. 2010. Use of respiratory syncytial virus surveillance data to optimize the timing of immunoprophylaxis. *Pediatrics* 126(1):e116-e123.
- 132.Patel H, Platt RW, Pেকেles GS, Ducharme FM. 2002. A randomized, controlled trial of the effectiveness of nebulized therapy with epinephrine compared with albuterol and saline in infants hospitalized for acute viral bronchiolitis. *The Journal of Pediatrics* 141(6):818-824.
- 133.Pavia AT. 2011. Viral Infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical Infectious Diseases* 52(Supplement 4):S284-S289.
- 134.Pelletier AJ, Mansbach JM, Camargo CA. 2006. Direct medical costs of bronchiolitis hospitalizations in the United States. *Pediatrics* 118(6):2418-2423.
- 135.Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology* 79(9):2221-2229.
- 136.Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial

- virus genotypes in 5 communities in North America. *Journal of Infectious Diseases* 181(6):1891-1896.
137. Perevoščikovs J, Lucenko I. 2010. Imunizācijas Valsts padomes sēdes protokols. Rīga: Imunizācijas Valsts padome. 1-9 p.
 138. Peters TR, Crowe JE. 2008. Respiratory syncytial virus. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. p 1112-1116.
 139. Pinto LA, Pitrez PM, Luisi F, de Mello PP, Gerhardt M, Ferlini R, Barbosa DC, Daros I, Jones MH, Stein RT, Marostica PJ. 2012. Azithromycin therapy in hospitalized infants with acute bronchiolitis is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. *The Journal of Pediatrics* 161(6):1104-1108.
 140. Pipavath S, Lynch D, Cool C, Brown K, Newell J. 2005. Radiologic and pathologic features of bronchiolitis. *American Journal of Roentgenology* 185(2):354-363.
 141. Prifert C, Streng A, Krempel C, Liese J, Weissbrich B. 2013. Novel respiratory syncytial virus a genotype, Germany, 2011-2012. *Emerging Infectious Diseases* 19(6):1029-1030.
 142. Qin X, Zhang C, Zhao Y, Zhao X. 2013. Genetic variability of subgroup A and B respiratory syncytial virus strains circulating in southwestern China from 2009 to 2011. *Archives of Virology* 158(7):1487-1495.
 143. Rafiefard F, Örvell C, Bondeson K. 2008. Genotyping of respiratory syncytial virus (RSV) group A in Stockholm, Sweden, using PCR and two-dimensional melting curve analysis. *APMIS* 116(4):317-322.
 144. Rebuffo-Scheer C, Bose M, He J, Khaja S, Ulatowski M, Beck E, Fan J, Kumar S, Nelson M, Henrickson K. 2011. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus A and B from Milwaukee, WI 1998-2010. *PLoS ONE* 6(10):e25468.
 145. Reiche J, Schweiger B. 2009. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology* 47(6):1800-1810.
 146. Resch B, Gusenleitner W, Müller W. 2002. The impact of respiratory syncytial virus infection: a prospective study in hospitalized infants younger than 2 years. *Infection* 30(4):193-197.
 147. Resch B, Manzoni P, Lanari M. 2009. Severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in infants with neuromuscular diseases and immune deficiency syndromes. *Paediatric Respiratory Reviews* 10(3):148-153.
 148. Reyes M, Eriksson M, Bennet R, Hedlund K, Ehrnst A. 1997. Regular pattern of respiratory syncytial virus and rotavirus infections and relation to weather in Stockholm, 1984--1993. *Clinical Microbiology and Infection* 3(6):640-646.
 149. Reynolds EOR, Cook CD. 1963. The treatment of bronchiolitis. *The Journal of pediatrics* 63(6):1205-1207.
 150. Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *Journal of Virology* 68(7):4538-4546.
 151. Rojas M, Granados Rugeles C, Charry-Anzola L. 2009. Oxygen therapy for lower respiratory tract infections in children between 3 months and 15 years of age. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 21(1):CD005975.

- 152.Root ED, Gaensbauer J, Nohynek H, Lucero M, Tanskanen A, Nillos L, Tallo V, Simeões EAF. 2012. Evolution of respiratory syncytial virus (RSV) over space and time in rural Filipino children. *Proceedings of the First ACM SIGSPATIAL International Workshop on Use of GIS in Public Health*. Redondo Beach, California: ACM. p 57-62.
- 153.Roqué i Figuls M, Giné-Garriga M, Granados Rugeles C, Perrotta C. 2012. Chest physiotherapy for acute bronchiolitis in paediatric patients between 0 and 24 months old. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2:CD004873.
- 154.Roth DE, Caulfield LE, Ezzati M, Black RE. 2008. Acute lower respiratory infections in childhood: opportunities for reducing the global burden through nutritional interventions. *Bulletin of the World Health Organization* 86(5):356-364.
- 155.Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. 2008. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health Organization* 86(5):408-416.
- 156.Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barreno B. 1991. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 65(6):3374-3378.
- 157.Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. 2011. Viral pneumonia. *The Lancet* 377(9773):1264-1275.
- 158.Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. 2012. Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLoS ONE* 7(11):e50660.
- 159.Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
- 160.Sande CJ, Mutunga MN, Medley GF, Cane PA, Nokes DJ. 2013. Group- and genotype-specific neutralizing antibody responses against respiratory syncytial virus in infants and young children with severe pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 207(3):489-492.
- 161.Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, James Nokes D, Medley GF, Cane PA. 2006. Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfections in infants from coastal Kenya. *Journal of Infectious Diseases* 193(1):59-67.
- 162.Scottish Intercollegiate Guidelines Network. 2006. Bronchiolitis in children. A national clinical guideline. Edinburgh: Scottish Intercollegiate Guidelines Network. 1-41 p.
- 163.Shaw K, Bell L, Sherman N. 1991. Outpatient assessment of infants with bronchiolitis. *American Journal of Diseases of Children* 145(2):151-155.
- 164.Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among us children, 1980–1996. *JAMA* 282(15):1440-1446.
- 165.Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. 2001. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US Children, 1979–1997. *Journal of Infectious Diseases* 183(1):16-22.
- 166.Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, Daput I, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. 2009. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 47(8):2475-2482.

167. Simmonds P, Smith DB. 1999. Structural constraints on RNA virus evolution. *Journal of Virology* 73(7):5787-5794.
168. Simões EAF. 1999. Respiratory syncytial virus infection. *The Lancet* 354(9181):847.
169. Simões EAF. 2003. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *The Journal of Pediatrics* 143(5):118-126.
170. Simões EAF, Carbonell-Estrany X. 2003. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22(2):S13-S20.
171. Skjerven HO, Hunderi JOG, Brüggmann-Pieper SK, Brun AC, Engen H, Eskedal L, Haavaldsen M, Kvenshagen B, Lunde J, Rolfsjord LB, Siva C, Vikin T, Mowinckel P, Carlsen K-H, Lødrup Carlsen KC. 2013. Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis. *New England Journal of Medicine* 368(24):2286-2293.
172. Smith DW, Frankel LR, Mathers LH, Tang ATS, Ariagno RL, Prober CG. 1991. A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. *New England Journal of Medicine* 325(1):24-29.
173. Sommer C, Resch B, Simões EAF. 2011. Risk factors for severe respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *The Open Microbiology Journal* 5:144-154.
174. Spurling G, Doust J, Del Mar C, Eriksson L. 2011. Antibiotics for bronchiolitis in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 15(6):CD005189.
175. Stensballe L, Devasundaram J, Simões E. 2003. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22(2):S21-S32.
176. Sullender WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clinical Microbiology Reviews* 13(1):1-15.
177. Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. 1993. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *Journal of Clinical Microbiology* 31(5):1224-1231.
178. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3):512-526.
179. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739.
180. Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJG, van Loon AM, Wiertz E, van Bleek GM, Martin DP, Coenjaerts FE. 2012. Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PLoS ONE* 7(12):e51439.
181. Tatochenko V, Uchaikin V, Gorelov A, Gudkov K, Campbell A, Schulz G, Prahl R, Notario G. 2010. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children ≤ 2 years of age hospitalized with lower respiratory tract infections in the Russian Federation: a prospective, multicenter study. *Clinical Epidemiology* (2):221-227.
182. Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, MacLellan K, Bedouelle H, Bricogne G, Bhella D, Eléouët J-F, Rey FA. 2009. Crystal

- structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326(5957):1279-1283.
183. Terletskaia-Ladwig E, Enders G, Schalasta G, Enders M. 2005. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. *BMC Infectious Diseases* 5(1):1-7.
 184. The IMPact-RSV Study Group. 1998. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 102(3):531-537
 185. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the united states. *JAMA* 289(2):179-186.
 186. Tran DN, Pham TMH, Ha MT, Tran TTL, Dang TKH, Yoshida L-M, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. 2013. Molecular epidemiology and disease severity of human respiratory syncytial virus in Vietnam. *PLoS ONE* 8(1):e45436.
 187. Trento A, Casas I, Calderón A, García-García ML, Calvo C, Perez-Breña P, Melero JA. 2010. Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene. *Journal of Virology* 84(15):7500-7512.
 188. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *Journal of General Virology* 84(11):3115-3120.
 189. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *Journal of Virology* 80(2):975-984.
 190. Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H. 2013. Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiology and Immunology*. Epub: June 11, 2013. doi: 10.1111/1348-0421.12075.
 191. United Nations. 2012. The Millennium Development Goals report 2012. New York: United Nations. 1-68 p.
 192. Valley-Omar Z, Muloiwa R, Hu N, Eley B, Hsiao N. 2013. Novel respiratory syncytial virus subtype ON1 among children, Cape Town, South Africa, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 19(4):668-670.
 193. van Niekerk S, Venter M. 2011. Replacement of previously circulating respiratory syncytial virus subtype B strains with the BA genotype in South Africa. *Journal of Virology* 85(17):8789-8797.
 194. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *Journal of General Virology* 82(9):2117-2124.
 195. Ventre K, Randolph A. 2007. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 24(1):CD000181.

- 196.von Linstow M, Eugen-Olsen J, Koch A, Winther T, Westh H, Høgh B. 2006. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *European Journal of Medical Research* 11(11):329-335.
- 197.Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, van Raemdonck DE, Schoonis A, Nawrot TS, Dupont LJ, Verleden GM. 2011. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *European Respiratory Journal* 37(1):164-172.
- 198.Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *Journal of Infectious Diseases* 175(4):814-820.
- 199.Wang E, Law B, Stephens D. 1995. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *The Journal of Pediatrics* 126(2):212-219.
- 200.Wang L-F, Collins PL, Fouchier RAM, Kurath G, Lamb RA, Randall RE, Rima BK. 2012. Family Paramyxoviridae. In: King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, editors. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. p 672-685.
- 201.Wennergren G, Kristjánsson S. 2001. Relationship between respiratory syncytial virus bronchiolitis and future obstructive airway diseases. *European Respiratory Journal* 18(6):1044-1058.
- 202.Wertheim JO, Worobey M. 2009. Relaxed selection and the evolution of RNA virus mucin-like pathogenicity factors. *Journal of Virology* 83(9):4690-4694.
- 203.Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82(12):4075-4079.
- 204.World Health Organization. 2012. *World health statistics 2012*. Geneva: World Health Organization. 1-176 p.
- 205.White L, Waris M, Cane P, Nokes D, Medley G. 2005. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiology and Infection* 133(2):279-289.
- 206.Wright P, Cutts F. 2000. Generic protocol to examine the incidence of lower respiratory infection due to respiratory syncytial virus in children less than five years of age: field test version. Geneva: Department of Vaccines and Other Biologicals, World Health Organization. 1-34 p.
- 207.Yamaguchi M, Sano Y, Daput IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, Shobugawa Y, Daput C, Uchiyama M, Suzuki H. 2011. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3):1034-1040.
- 208.Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. 2012. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. *Journal of Medical Microbiology* 61(6):820-829.

209. Zamora MR, Budev M, Rolfe M, Gottlieb J, Humar A, DeVincenzo J, Vaishnaw A, Cehelsky J, Albert G, Nochur S, Gollob JA, Glanville AR. 2011. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183(4):531-538.
210. Zhang L, Mendoza-Sassi R, Wainwright C, Klassen T. 2008. Nebulized hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 8(4):CD006458.
211. Zhang R-F, Jin Y, Xie Z-P, Liu N, Yan K-L, Gao H-C, Song J-R, Yuan X-H, Xiao N-G, Guo M-W, Zhou Q-H, Hou Y-D, Duan Z. 2010. Human respiratory syncytial virus in children with acute respiratory tract infections in China. *Journal of Clinical Microbiology* 48(11):4193-4199.
212. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2):203-214.
213. Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme A-M, van Ranst M. 2005. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *Journal of Virology* 79(14):9157-9167.
214. Zlateva KT, Lemey P, Vandamme A-M, van Ranst M. 2004. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup A: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. *Journal of Virology* 78(9):4675-4683.
215. Zlateva KT, van Ranst M. 2004. Detection of subgroup B respiratory syncytial virus in the cerebrospinal fluid of a patient with respiratory syncytial virus Pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 23(11):1065-1066.
216. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, van Ranst M. 2007. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9):3022-3030.

10. PIELIKUMI

Veidlapa Nr E-9 (2)

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel.67409137

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Profesore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
2. Asoc. prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
3. Docente Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Profesore Regīna Kleina	Dr.med.	patanatoms
5. Asoc. prof. Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
6. Asoc. prof. Egils Korņevs	Dr.habil.med.	stomatologs

Pieteikuma iesniedzējs: Dr. habil.med. profesore Dace Gardovska
RSU Pediatrijas katedra

Pētījuma nosaukums: Bērniem nozīmīgo pneimovīrusu (RSV un hMPV) izraisītās dziļās elpceļu infekcijas, to klīniskais un molekulārais raksturojums terciārā līmeņa hospitālī Latvijā.

Iesniegšanas datums: 03.03.2009.

Pētījuma protokols:

- (X) Pētījuma veids: izmeklēšanas protokols, klīniskie un laboratoriskie izmeklējumi
(X) Pētījuma populācija: 2 – 24 mēnešus veci BKUS hospitalizēti bērni ar klīniskām akūtas dziļo elpceļu infekcijas pazīmēm (klepus, izmainīta auskultatīvā atradne, palielināts elpošanas darbs, apnojes lēkme), kas slimo mazāk par 10 dienām un ir bijuši iepriekš veseli.
(X) Informācija par pētījumu:
(X) Piekrišana dalībai pētījumā:

Citi dokumenti:

1. Vecāku piekrišanas formas paraugs
2. VSIA BKUS valdes priekšsēdētāja piekrišana pētījuma veikšanai

Lēmums: piekrist biomedicīniskajam pētījumam

Komitejas priekšsēdētāja vietniece Vija Sīle

Paraksts _____

Ētikas komitejas sēdes datums: 12.03.2009.

1. pielikums. Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauja veikt šo pētījumu.

2009. gada 12. marta sēdes lēmuma kopija.