



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Santa Rasa

PERSISTENTU VĪRUSU
INFEKCIJU SAISTĪBA AR
MIALGĪSKO ENCEFALOMIELĪTU/
HRONISKĀ NOGURUMA SINDROMU

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – mikrobioloģija un virusoloģija

Rīga, 2017

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē (RSU) A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā sadarbībā ar RSU Veselības centru “Ambulance”, Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas stacionāru “Latvijas Infektoloģijas centrs”, Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Neuroloģijas klīniku un Valsts asinsdonoru centru.

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med. asociētā profesore **Modra Murovska**,
Rīgas Stradiņa universitātes
A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. habil. med. profesore **Aija Žileviča**,
Latvijas Universitāte

Dr. biol. sci. profesors **Mykolas Mauricas**,
Valsts pētniecības institūta Inovatīvās medicīnas pētniecības centrs,
Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2017. gada 11. decembrī plkst. 15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē: www.rsu.lv.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu (2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009).

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Simona Doniņa**

SATURS

Saīsinājumi	5
Ievads.....	6
Pētījuma zinātniskā novitāte	8
Pētījuma mērķis	8
Pētījuma uzdevumi.....	8
Pētījuma hipotēzes	9
Pētījuma struktūra	9
1. Materiāls un metodes.....	10
1.1. Pacienti un bioloģiskais materiāls	10
1.2. Molekulārās metodes	11
1.3. Imunoloģijas metodes	12
1.4. Filoģenētiskā analīze.....	14
1.5. Statistiskā analīze	14
2. Rezultāti.....	15
2.1. Pacienti ar ME/CFS	15
2.2. XMRV genoma secību analīze pacientiem ar ME/CFS.....	15
2.3. HHV-6 iesaiste ME/CFS attīstībā	15
2.3.1. HHV-6 specifisko antivielu klātbūtne	15
2.3.2. HHV-6 genoma secību biežums.....	16
2.3.3. HHV-6 slodze	16
2.3.4. HHV-6 antigēnu klātbūtne	17
2.3.5. HHV-6 saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem	17
2.3.6. Citokīnu līmenis HHV-6 infekcijas gadījumā.....	18
2.4. HHV-7 iesaiste ME/CFS attīstībā	19
2.4.1. HHV-7 specifisku antivielu un genoma secību klātbūtne	19
2.4.2. HHV-7 slodze	19
2.4.3. HHV-7 saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem	20
2.4.4. Citokīnu līmenis HHV-7 infekcijas gadījumā.....	21
2.5. B19V iesaiste ME/CFS attīstībā.....	22
2.5.1. B19V specifisku antivielu klātbūtne	22
2.5.2. B19V genoma secību biežums	22
2.5.3. B19V slodze.....	22
2.5.4. B19V antivielu spektrs	23
2.5.5. B19V saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem.....	23
2.5.6. Citokīnu līmenis B19V infekcijas gadījumā	25
2.5.7. B19V filoģenētiskā analīze	26
2.6. HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas iesaiste ME/CFS attīstībā.....	27
2.6.1. Vīrusu infekcijas/koinfekcijas biežums.....	27

2.6.2. Vīrusu slodze pacientiem ar koinfekciju.....	28
2.6.3. Citokīnu līmenis ME/CFS pacientiem ar vīrusu infekciju/koinfekciju	30
2.6.4. ME/CFS tipiskie klīniskie simptomi pacientiem ar infekciju/koinfekciju	31
2.6.5. ME/CFS smagums pacientiem ar infekciju/koinfekciju	33
3. Diskusija.....	35
4. Secinājumi.....	52
5. Rekomendācijas	53
6. Publikācijas par pētījuma tēmu	54
6.1. Raksti žurnālos, kas iekļauti starptautiskās datu bāzēs	54
6.2. Raksti citos žurnālos un rakstu krājumos	54
6.3. Prezentācijas starptautiskās konferencēs/kongresos	55
6.4. Prezentācijas vietēja mēroga konferencēs/kongresos	57
7. Izmantotā literatūra	58
Pateicības	65

SAĪSINĀJUMI

B19V	cilvēka parvovīruss B19
bp	bāzu pāri
CDC	Slimību kontroles un profilakses centrs
cDNS	komplementārā dezoksiribonukleīnskābe
CNS	centrālā nervu sistēma
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
dNTP	dezoksiribonukleotīdtrifosfāts
EBV	Epšteina-Barra vīruss
ELISA	imūnenzimātiskais tests
HHV	cilvēka herpesvīruss
ICD-10	Starptautiskā statistiskā slimību un veselības problēmu klasifikācija (<i>International statistical classification of diseases and related health problems</i>)
IgG	imūnglobulīns G
IgM	imūnglobulīns M
IL	interleikīns
IQR	starpkvartiļu diapazons
ME/CFS	mialģiskais encefalomiēlīts/hroniskā noguruma sindroms
MgCl ₂	magnija hlorīds
ml	mililitri
μl	mikrolitri
nm	nanometri
ng	nanogrami
pg	pikogrami
mRNS	matrices ribonukleīnskābe
nPKR	polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu
PBMC	perifēro asiņu mononukleārās šūnas
PKR	polimerāzes ķēdes reakcija
RT	reversā transkripcija
SD	standartnovirze
TNF-α	tumora nekrozes faktors alfa
XMRV	ksenotropais peļu leukozes vīrusam radniecīgais vīruss

IEVADS

Mialģiskais encefalomiēlīts/hroniskā noguruma sindroms (ME/CFS) ir hroniska, kompleksa slimība, kas ietver centrālās nervu sistēmas (CNS) un imūnsistēmas traucējumus, šūnu enerģijas metabolisma un jonu transporta disfunkciju, kā arī kardiovaskulāros traucējumus (*Carruthers et al.*, 2011). Šo slimību galvenokārt raksturo smags hronisks nogurums, ko pavada tādi klīniskie simptomi, kā jutīgi limfmezgli kaklā vai padusēs, muskuļu sāpes, locītavu sāpes bez pietūkuma vai apsārtuma, vārgums pēc piepūles, kas ilgst vairāk par 24 stundām, atmiņas/koncentrēšanās traucējumi, galvassāpes, kakla sāpes un neatspirdzinošs miegs (*Fukuda et al.*, 1994; *Carruthers et al.*, 2011).

Ziņojumi par ME/CFS sastopamību ir atšķirīgi un atkarīgi no pielietotajiem diagnostikas kritērijiem un tā ir noteikta no 0,76% klīniski diagnosticētās līdz 3,48% no pašdiagnoticētās populācijas (*Johnston et al.*, 2013). Joprojām nav vienprātības par vienotiem slimības diagnostikas kritērijiem. Diagnoze ir balstīta uz diferenciāldiagnostiku un klīnisko simptomu kopu, tāpēc ir nepieciešams identificēt specifiskus ME/CFS biomarkierus. Taču, pašlaik šai slimībai nepastāv efektīvi un standartizēti diagnostikas testi, profilakses un ārstēšanas stratēģijas (*Albright et al.*, 2011; *Bansal et al.*, 2012).

Vīrusu infekciju uzskata par vienu no potenciālajiem ME/CFS etioloģiskajiem faktoriem, kas, papildināta ar imūnsistēmas traucējumiem, var veicināt slimības simptomu uzturēšanu (*Bansal et al.*, 2012; *Fischer et al.*, 2014). Daudzi pacienti apstiprina, ka ME/CFS sācies ar gripai līdzīgiem simptomiem. Turklāt, vīrusa infekcija varētu radīt novērotos imūnsistēmas traucējumus vai arī vīrusa infekcija var sekot imūnsistēmas traucējumiem. Vīrusu infekcijas loma ME/CFS joprojām paliek neskaidra (*Morinet and Corruble*, 2012, *Underhill*, 2015). Infekciozie aģenti, kas pētīti saistībā ar ME/CFS ir hepatīta C vīruss, cilvēka imūndeficīta vīruss, koksaki B, Epšteina-Barra vīruss (EBV), cilvēka herpesvīruss (HHV)-6, cilvēka

parvovīrus B19 (B19V) un tādas baktērijas, kā borēlijas, hlamīdijas un mikoplazmas. Tomēr, viena specifiska infekciozā aģenta saistība ar ME/CFS līdz šim nav apstiprināta (*Nicolson et al.*, 2003; *Bansal et al.*, 2012; *Chapenko et al.*, 2012; *Halpin et al.*, 2017; *Loebel et al.*, 2017).

Pētījumi par ksenotropā peļu leikozes vīrusam radniecīgā vīrusa (XMRV) saistību ar ME/CFS aizsākās pēc publicēta ziņojuma par bieži atrastu XMRV pacientiem ar ME/CFS (*Lombardi et al.*, 2009), taču saistība neapstiprinājās. ME/CFS varētu rasties presistentas herpesvīrusu reaktivācijas rezultātā, ko pacientiem ar ME/CFS atrod biežāk nekā donoriem (*Chapenko et al.*, 2006; *Krueger and Ablashi*, 2006). Līdzīgi, B19V infekciju konstatē ME/CFS aizsākumā, tādējādi arī tas varētu būt šo slimību izraisošais faktors (*Fremont et al.*, 2009). Daži pētnieki ziņo, ka minēto vīrusu reaktivācija varētu kalpot par objektīvu biomarķieri (*Ablashi et al.*, 2000; *Chapenko et al.*, 2006; *Kerr et al.*, 2010; *Aoki et al.*, 2016). Turpretim, citi neatrod HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas saistību ar ME/CFS etiopatoģenēzi (*Koelle et al.*, 2002; *Cameron et al.*, 2010). Dažādos pētījumos, analizējot vairāku citokīnu produkcijas izmaiņas pacientiem ar ME/CFS, ir noteikti arī imūnsistēmas traucējumi (*Russell et al.*, 2016; *Mensah et al.*, 2017). Tas pamato nepieciešamību veikt pētījumus, lai noskaidrotu minēto vīrusu lomu ME/CFS, kā arī, lai noteiktu slimības etioloģijas, progresijas un uzturēšanas mehānismus, un biomarķierus.

Promocijas darbs izstrādāts RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā, kur bija aizsākti pirmie pētījumi par ME/CFS Latvijā. Lai noskaidrotu HHV-6, HHV-7, B19V un XMRV lomu ME/CFS, tika noteikta vīrusu infekcijas marķieru klātbūtne un infekcijas aktivitāte, izmantojot molekulārās bioloģijas, imunoloģijas un statistikas metodes, un atrades korelētas ar slimības klīniskajām pazīmēm un slimības gaitu. Visi izmantotie materiāli un metodes ir detalizēti aprakstīti turpmāk.

Pētījuma zinātniskā novitāte

Lai noskaidrotu HHV-6, HHV-7, B19V un XMRV infekcijas iesaisti ME/CFS attīstībā, šajā pētījumā pacientiem ar ME/CFS tika noteikts persistentas vīrusu infekcijas un koinfekcijas biežums un aktivitāte, vīrusu slodze, laiks no infekcijas sākuma, citokīnu līmenis un saistība ar klīniskajiem simptomiem.

Pētījuma mērķis

Noteikt cilvēka herpesvīrusa-6, cilvēka herpesvīrusa-7, parvovīrusa B19 un ksenotropā peļu leikozes vīrusam radniecīgā vīrusa iesaisti mialģiskā encefalomiēlīta/hroniskā noguruma sindroma etiopatogēnēzē.

Pētījuma uzdevumi

1. Noteikt XMRV provīrusa genoma secību klātbūtni DNS, kas izolēta no ME/CFS pacientu perifērajām asinīm.
2. Noteikt HHV-6 un HHV-7 specifisko antivielu un genoma secību sastopamības biežumu, infekcijas aktivitātes fāzi, vīrusu slodzi, kā arī HHV-6 tipu un antigēnu ekspresiju pacientiem ar ME/CFS.
3. Noteikt B19V specifisko antivielu un genoma secību klātbūtnes biežumu, infekcijas aktivitātes fāzi, vīrusa slodzi, genotipu un laika periodu no B19V infekcijas parādīšanās pacientiem ar ME/CFS.
4. Noteikt citokīnu (IL-6, TNF- α , IL-12, IL-4 un IL-10) ekspresijas līmeni pacientiem ar persistentu infekciju/koinfekciju latentā un aktīvā fāzē.
5. Analizēt HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas saistību ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem.
6. Noteikt infekcijas aktivitātes ietekmi uz ME/CFS klīniskās gaitas smagumu.

Pētījuma hipotēzes

1. Persistenta vīrusu infekcija, kā beta-herpesvīrusu HHV-6 un HHV-7, un parvovīrusa B19V infekcija, ir ME/CFS palaidējfaktors un ir saistīta ar ME/CFS attīstību.
2. Būtiska nozīme ir vīrusa infekcijas aktivitātes fāzei, jo aktīva infekcija izraisa dziļākus imunoloģiskos traucējumus un ir saistīta ar smagāku ME/CFS klīnisko gaitu.
3. XMRV varētu būt saistīts ar ME/CFS attīstību (apstiprināt vai noraidīt šo hipotēzi).

Pētījuma struktūra

Promocijas darbs ir uzrakstīt angļu valodā. Tas satur sekojošas sadaļas: ievads, zinātniskā novitāte, mērķis, uzdevumi un pētījuma hipotēzes, kā arī literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, rekomendācijas, publikāciju saraksts, izmantotā literatūra un pateicības. Promocijas darbs uzrakstīts uz 111 lapām ar septiņām tabulām un 19 attēliem, un satur atsauces uz 229 literatūras avotiem. Pētījuma rezultāti publicēti 10 rakstos un mutisku vai stenda ziņojumu veidā prezentēti 20 vietēja un starptautiska mēroga konferencēs/kongresos.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Pacienti un bioloģiskais materiāls

Pētījums veikts saskaņā ar drošības un ētikas standartiem, kā arī atbilstoši Latvijas Republikas un Eiropas Savienības likumiem un prasībām. Pētījuma kohorta izveidota ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas Komitejas atļauju, kas izsniegta 2012. gada 27. septembrī. Visi iekļautie pacienti pirms pētījuma sniedza informētu piekrišanu.

Divi simti pacienti [130 (65%) sievietes un 70 (35%) vīrieši ar vidējo vecumu 38 ± 12 gadi] ar klīniski diagnosticētu ME/CFS saskaņā ar 1994 *Fukuda Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) kritērijiem tika iekļauti šajā šķērsgriezuma pētījumā. Saskaņā ar ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* – Starptautiskā statistiskā slimību un veselības problēmu klasifikācija), ME/CFS diagnosticēšanai Latvijā izmantoja G93.3 – nogurums pēc vīrusa infekcijas (mialģiskais encefalomyelīts), R53 – nogurums un nespēks un B94.8 – citu precizētu infekcijas un parazitāru slimību sekas. Pacientu iekļaušanai pētījumā izmantoja ieslēgšanas un izslēgšanas kritērijus. Pētījuma kontroles grupā iekļāva 150 vecumam un dzimumam atbilstošus praktiski veselus indivīdus (asins donorus).

Klīniskie paraugi tika saņemti no Rīgas Austrumu Klīniskās universitātes slimnīcas stacionāra “Latvijas Infektoloģijas centrs”, RSU Veselības centra “Ambulance”, Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Neuroloģijas klīnikas un Valsts asinsdonoru centra. Asiņu paraugus savāca stobriņos ar etilēndiamīntetraetiķskābi – EDTA, transportēja uz A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta laboratoriju, kur sagatavoja un uzglabāja pilnu asiņu, no šūnām brīvas asins plazmas un perifēro asiņu mononukleāro šūnu (PBMC) alikvotas.

1.2. Molekulārās metodes

DNS izolēja no perifērajām asinīm ar fenola-hloroforma ekstrakcijas metodi un no asins plazmas paraugiem – izmantojot *QIAamp DNA Blood Kit*, (Qiagen GmbH, Vācija).

RNS izolēja no PBMC ar *Tri Reagent* (Applied Biosystems, ASV). RNS klātbūtni analizēja elektroforētiski 1% agarozes gelā un vizualizēja. Spektrofotometriski noteica izolētās DNS un RNS **koncentrāciju**.

Komplementāro DNS (cDNS) sintezēja ar reverso transkripciju (RT) izmantojot komerciāli pieejamo komplektu *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, ASV).

Polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) β -globīna gēna detektēšanai veica saskaņā ar *Vandamme et al.*, 1995, lai noteiktu no perifērajām asinīm izolētās **DNS** un sintezētās **cDNS** kvalitāti un izslēgtu no plazmas izolētās DNS kontaminācijas iespējamību ar šūnu DNS.

PĶR ar iekšējo praimēšanu (nPĶR) lietoja vīrusu un provīrusa genomu secību klātbūtnes noteikšanai pacientu un praktiski veselu indivīdu DNS. XMRV provīrusa *env* un *gag* sekvenču klātbūtni noteica DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm, saskaņā ar *Lombardi et al.*, 2009 un *Lo et al.*, 2010. nPĶR jutība bija piecas kopijas reakcijā un kā pozitīvo kontroli izmantoja XMRV VP62 plazmīdu (*Urisman et al.*, 2006; *Dong et al.*, 2007).

nPĶR lietoja arī HHV-6, HHV-7 un B19V specifisku genoma secību amplificēšanai DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm (persistentas infekcijas marķieris) un no šūnām brīvas asins plazmas (aktīvas infekcijas marķieris). HHV-6 (U3 gēna) un HHV-7 (U10 gēna) genoma secību noteikšanu veica saskaņā ar *Secchiero et al.*, 1995 un *Berneman et al.*, 1992, attiecīgi. Kā pozitīvo kontroli izmantoja HHV-6 un HHV-7 genomisko DNS (*Advanced Biotechnologies Inc, Columbia, MD*, ASV). HHV-6 specifisko praimeru jutība bija trīs kopijas un HHV-7 – viena kopija reakcijā (*Tomsone et al.*, 2001;

Kozireva et al., 2008). Cilvēka parovīrusa B19V genoma secības klātbūtni noteica saskaņā ar Barah et al., 2001, lietojot praimerus, kas komplementāri NS1 gēnam. Kā pozitīvo kontroli izmantoja virēmiska seruma DNS. Praimeru jutība bija 1 – 10 kopijas reakcijā (Barah et al., 2001).

HHV-6A un HHV-6B diferencēja saskaņā ar Lyall and Cubie, 1995. Pēc nPQR veikšanas, amplifikācijas produktus sašķēla ar HindIII restrikcijas endonukleāzēm (Thermo Scientific, ASV), kas šķēļ HHV-6B 163 bp amplifikācijas produktu 66 bp un 97 bp fragmentos, bet nešķēļ HHV-6A.

PQR lietoja vīrusspecifisko DNS secību amplificēšanai cDNS paraugos, kas iegūti no PBMC izolētas RNS. HHV-6 U89/90 nekavējoši agrīnā gēna ekspresiju noteica saskaņā ar Van den Bosch et al., 2001, taču HHV-7 U57 un B19V NS1 gēnu ekspresiju detektēja atbilstoši Ito et al., 2013.

Elektroforētisko analīzi veica agarozes gelā, lai atdalītu un identificētu ar PQR amplificētos DNS fragmentus.

HHV-6, HHV-7 un B19V slodzi noteica ar **reālā-laika PQR** saskaņā ar ražotāja instrukcijām, kā matricu lietojot DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm. HHV-6 slodzi detektēja ar *HHV-6 Real-TM Quant* un B19V – ar *Parvovirus B19 Real-TM Quant* (Sacace Biotechnologies, Itālija) darba komplektiem. HHV-7 slodzi noteica lietojot *Human Herpes Virus 7 genomes genesig* (Primerdesign, Apvienotā Karaliste) komplektu un laboratorijā izveidotu *in-house* reālā-laika PQR HHV-7 U90 un PI15 gēnu secību amplificēšanai, kas balstīts uz Prusty et al., 2013 iepriekš publicētu ziņojumu.

1.3. Imunoloģijas metodes

IgM un IgG klases antivielas pret HHV-6 detektēja ar HHV-6 IgM un HHV-6 IgG **imūnfermentatīvajiem testiem** (*enzyme linked immunosorbent assay – ELISA*) (Panbio, Austrālija) un *HHV-6 IgG Antibody ELISA kit* (Advanced Biotechnologies, Columbia MD, ASV). HHV-7 specifiskās IgG

klases antivielas noteica ar imūnfluorescences metodi, lietojot *HHV-7 IgG IFA* (*Advanced Biotechnologies, Columbia MD, ASV*) darba komplektu, bet B19V specifiskās IgM un IgG klases antivielas noteica ar *Biotrin Parvovirus B19 Enzyme Immunoassay* (*Biotrin Ltd, Īrija*), *recomWell Parvovirus B19 Enzyme Immunoassay* un *recomLine Parvovirus B19 IgM and IgG* (*Mikrogen Diagnostik, Vācija*) darba komplektiem. Antivielas pret B19V antigēniem (Vp-2p; VP-N; VP-1S; VP-2r; VP-C; NS-1) identificēja, lai noteiktu laika periodu no B19V infekcijas sākuma, balstoties uz antivielu spektru (*Pfreppe et al., 2005*).

Citokīnu līmeni noteica asins plazmā. IL-4 līmeni detektēja lietojot *Endogen Human ELISA kit* (*Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ASV*), IL-6 līmeni – ar *eBioscience Human IL-6 Platinum ELISA* (*eBioscience Europe/International, Austrija*), IL-10 līmeni - lietojot *BIOSOURCE IL-10 EASIA* (*Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay*) no *BioSource Europe S.A.*, Beļģija un *eBioscience Human IL-10 Platinum ELISA* (*eBioscience Europe/International, Austrija*), IL-12 (p70) līmeni - ar *eBioscience Human IL-12p70 Platinum ELISA* (*eBioscience Europe/International, Austrija*), un TNF- α līmeni – izmantojot *Biorbyt Human TNFa ELISA* (*Biorbyt, Apvienotā Karaliste*) darba komplektiem.

HHV-6 antigēnu ekspresiju detektēja ar netiešās imūnfluorescences metodi PBMC paraugos, izmantojot sekojošas primārās peles antivielas: anti-p41 (klons 6A5D12), HHV6B specifiskas anti-gH (gp100) (klons OHV-3) un HHV-6A un HHV-6B specifiskas anti-gB (gp116) (klons OHV-1), un sekundārās antivielas [truša anti-peles *FITC-conjugated* (*Dako*) sera].

1.4. Filoģenētiskā analīze

Filoģenētiskās analīzes veikšanai daļu no cilvēka parvovīrusa B19V NS gēniem (396 bp) salīdzināja ar *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation – MUSCLE* metodi, kas iekļauta MEGA 6 programmatūrā. Filoģenētiskos kokus rekonstruēja ar *neighbour-joining* un *maximum likelihood* metodēm, izmantojot MEGA 6 un PhyML 3.0 programmas (Guindon et al., 2010; Tamura et al., 2013).

1.5. Statistiskā analīze

Statistisko analīzi veica lietojot *GraphPad Prism 7.0* programmu. Diskrētus mainīgos aprakstīja skaitļos un procentos, un dzimuma, vīrusspecifisko antivielu, antigēnu un vīrusu marķieru klātbūtnes biežuma atšķirības starp grupām noteica, izmantojot Hī kvadrāta kritēriju un Fišera eksakto testu. Nepārtrauktas skalas mainīgos aprakstīja ar vidējo vērtību $\pm$ standartnovirze (SD) vai mediānu (starpkvartiļu diapazons – IQR). Ņemot vērā datu izkliedi, vīrusu slodzi un citokīnu līmeni analizēja ar *Analysis of variance – ANOVA* un Manna–Vitnija neparametriskajiem testiem. Par statistiski nozīmīgu uzskatīja vērtību $p \leq 0,05$.

2. REZULTĀTI

2.1. Pacienti ar ME/CFS

No 200 pētījumā iesaistītajiem pacientiem ar ME/CFS, 79% bija vecumā no 25 – 50 gadiem. Visiem pacientiem bija neizskaidrojams hronisks nogurums, kas ilgst vairāk kā sešus mēnešus ($p < 0,0001$). Visbiežāk novērotie simptomi pacientiem ar ME/CFS bija atmiņas traucējumi, samazināta koncentrēšanās spēja un miega traucējumi. Visi pacienti ziņoja par ME/CFS simptomu sākšanos 6 – 36 mēnešus pirms iesaistīšanās pētījumā, vidēji ($\pm$ SD) $10,2 \pm 4,2$ mēneši. 85% pacientiem ME/CFS simptomi sākušies 8 – 12 mēnešus pirms iekļaušanas pētījumā.

2.2. XMRV genoma secību analīze pacientiem ar ME/CFS

XMRV provīrusa *gag* un *env* gēnu secības nedetektēja nevienā no 150 ME/CFS pacientu un 30 praktiski veselu indivīdu DNS paraugā, kas izolēta no perifērajām asinīm. Tikai pozitīvajās kontrolēs pēc pirmā cikla amplificēti 735 bp un 351 bp, bet pēc otrā cikla – 410 bp un 218 bp amplimēri, kas atbilst paredzētajiem XMRV *gag* un *env* gēnu fragmentiem, attiecīgi.

2.3. HHV-6 iesaiste ME/CFS attīstībā

2.3.1. HHV-6 specifisko antivielu klātbūtne

HHV-6 specifiskās antivielas detektēja 92,1% (151/164) analizēto pacientu ar ME/CFS un 76,7% (69/90) praktiski veselu indivīdu asins plazmas paraugos ($p = 0,0009$). Anti-HHV-6 IgG klases antivielas bija 90,9% (149/164) no pacientiem un 76,7% (69/90) no praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,0026$), taču IgM klases antivielas bija 6,1% (10/164) no pacientiem un 2,2% (2/90) no praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,2227$).

2.3.2. HHV-6 genoma secību biežums

Lietojot nPQR, HHV-6 genoma secību klātbūtni atrada 53% (106/200) no pacientiem ar ME/CFS un 28,7% (43/150) no praktiski veseliem indivīdiem ($p < 0,0001$). No tiem HHV-6 genoma secības klātbūtne DNS, kas izolēta no perifēro asiņu leukocītiem (persistentas infekcijas latentās fāzes marķieris) bija 42% (84/200) pacientu un 28,7% (43/150) veselo indivīdu ($p = 0,0133$), taču genoma secību klātbūtne DNS no asins plazmas (persistentas infekcijas aktīvās fāzes marķieris) – 11% (22/200) pacientu un nevienam no veseliem indivīdiem ($p < 0,0001$). HHV-6A konstatēja vienam un HHV-6B pārējiem no pacientiem ($p < 0,0001$). Lietojot RT-PQR, HHV-6 U89/90 gēna ekspresiju PBMC atrada 78% (57/73) no pacientiem, kam iepriekš ar nPQR atrasta HHV-6 genoma secības klātbūtne DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm.

2.3.3. HHV-6 slodze

HHV-6 slodze bija paaugstināta (>10 kopijas/ 10^6 šūnās) 66% (66/100) no analizētajiem pacientiem ar ME/CFS un 2/10 praktiski veseliem indivīdiem ar iepriekš konstatētu HHV-6 genoma secības klātbūtni ar nPQR ($p = 0,0064$). Pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju latentā fāzē HHV-6 slodzes mediāna (IQR) bija 279 (1022–54,5) kopijas/ 10^6 šūnās, taču pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju aktīvā fāzē – 1927 (6732–348,5) kopijas/ 10^6 šūnās ($p = 0,0019$). 43,6% (34/78) no pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju latentā fāzē vīrusa slodze bija < 10 kopijām/ 10^6 šūnās. Sešiem pacientiem vīrusa slodzes mediāna (IQR) bija 1209033 (1464421–808183) kopijas/ 10^6 šūnās.

2.3.4. HHV-6 antigēnu klātbūtne

Analizējot 36 pacientu PBMC ar netiešās imūnfluorescences metodi, p41 ekspresija pierādīta sešiem pacientiem ar ME/CFS [paraugi bija pozitīvi izmantojot HHV-6 specifiskas anti-p41 (klons 6A5D12) antivielas], gp100 ekspresija atrasta 15 pacientiem [paraugi bija pozitīvi izmantojot HHV6B specifiskas anti-gH (gp100) (klons OHV-3) antivielas], un gp116 ekspresijas klātbūtni konstatēja septiņiem pacientiem ar ME/CFS [paraugi bija pozitīvi izmantojot HHV6A un HHV6B specifiskas anti-gB (gp116) (klons OHV-1) antivielas].

2.3.5. HHV-6 saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem

ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība un persistēntas HHV-6 infekcijas (latentā un aktīvā fāzē) marķieru klātbūtne pacientiem ar ME/CFS ir apkopta 2.1. tabulā.

2.1. tabula

ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība ME/CFS pacientiem ar persistētu HHV-6 infekciju latentā un aktīvā fāzē

Simptomi	Latenta HHV-6, n (%)	Aktīva HHV-6, n (%)	P vērtība
Hronisks nogurums > 6 mēnešus	84 (100%)	22 (100%)	> 0,9999
Vārgums pēc piepūles	53 (63,1%)	14 (63,6%)	> 0,9999
Atmiņas traucējumi	55 (65,5%)	17 (77,3%)	0,4418
Samazināta koncentrēšanās	62 (73,8%)	14 (63,6%)	0,4261
Miega traucējumi	64 (76,2%)	18 (81,8%)	0,7762
Subfebrilitāte	49 (58,3%)	13 (59,1%)	> 0,9999
Limfadenopātija	48 (57,1%)	10 (45,5%)	0,3469
Muskuļu sāpes	46 (54,8%)	12 (54,5%)	> 0,9999
Locītavu sāpes	36 (42,9%)	10 (45,5%)	> 0,9999
Jauna tipa galvassāpes	37 (44%)	9 (40,9%)	0,8146

2.3.6. Citokīnu līmenis HHV-6 infekcijas gadījumā

Mediānas (IQR) koncentrācija (pg/ml) un procentuālais pacientu daudzums ar paaugstinātu iekaisuma (IL-6, TNF- α , un IL-12) un pretiekaisuma (IL-4 un IL-10) citokīnu līmeni pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju latentā un aktīvā fāzē attēloti 2.2. tabulā.

2.2. tabula

Citokīnu līmenis ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju latentā un aktīvā fāzē

Novērtētie parametri \ Citokīns, jutība	IL-6, 0,92 pg/ml	TNF- α , < 1 pg/ml	IL-4, < 2 pg/ml	IL-10, < 1 pg/ml	IL-12 (p70), 2,1 pg/ml
Persistenta HHV-6 infekcija latentā fāzē					
Mediāna (IQR)	3,8 (5,2–2,0)	68,0 (126,4–39)	< 2	15,5 (36,4–8)	12,0 (16,8–4,6)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	28,8	80,0	0,0	78,5	96,6
Persistenta HHV-6 infekcija aktīvā fāzē					
Mediāna (IQR)	4,4 (26,9–1,3)	67,0 (113,6–55)	< 2	20,0 (52,4–11,9)	15,1 (18,6–14)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	55,0	81,0	0,0	88,9	100,0
Manna–Vitnija tests [latentā vs aktīva infekcija (pg/ml)]	0,9493	0,919	–	0,4789	*0,0386
Fišera eksaktais tests [paaugstināts citokīnu līmenis latentā vs aktīva infekcija (pacientu skaits)]	*0,0356	> 0,9999	>0,9999	0,6759	> 0,9999

* statistiski būtisks ($p < 0,05$)

– nenosakāms

2.4. HHV-7 iesaiste ME/CFS attīstībā

2.4.1. HHV-7 specifisku antivielu un genoma secību klātbūtne

HHV-7 specifiskās IgG klases antivielas detektēja 84,6% (11/13) no pacientiem ar ME/CFS un 93,8% (30/32) no analizētajiem praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,5672$).

Persistentas HHV-7 infekcijas marķierus ar nPQR detektēja 92% (184/200) no pacientiem ar ME/CFS un 75,3% (113/150) no praktiski veseliem indivīdiem ($p < 0,0001$). No tiem HHV-7 genoma secības klātbūtni DNS, kas izolēta no perifēro asiņu leukocītiem atklāja 58% (116/200) ME/CFS pacientiem un 67,3% (101/150) praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,0766$), taču genoma secību klātbūtni DNS no asins plazmas – 34% (68/200) no pacientiem un 8% (12/150) no praktiski veseliem indivīdiem ($p < 0,0001$).

Lietojot RT-PQR, HHV-7 U57 gēna ekspresiju PBMC atrada 45,7% (58/127) ME/CFS pacientu, kam iepriekš ar nPQR konstatēta HHV-7 genoma secības klātbūtne DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm.

2.4.2. HHV-7 slodze

HHV-7 slodze bija paaugstināta (> 10 kopijas/ 10^6 šūnās) 67,3% (113/168) no analizētajiem pacientiem ar ME/CFS un 31,4% (16/51) no analizētajiem praktiski veseliem indivīdiem, kam iepriekš detektēta HHV-7 genoma secības klātbūtne ar nPQR ($p < 0,0001$).

ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju latentā fāzē mediānas (IQR) vīrusa slodze bija 196,7 (533–132) kopijas/ 10^6 šūnās un aktīvā fāzē – 238,6 (410,6–80,2) kopijas/ 10^6 šūnās ($p = 0,3502$). HHV-7 slodzi < 10 kopijām/ 10^6 šūnās detektēja 37,1% (39/105) no pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju latentā fāzē un 25,4% (16/63) no pacientiem ar persistentu

HHV-7 infekciju aktīvā fāzē, kā arī 68,6% (35/51) no praktiski veseliem indivīdiem ar persistentu HHV-7 infekciju.

Vienam no pacientiem ar ME/CFS HHV-7 slodze pilnās asinīs bija $1140127,6$ kopijas/ 10^6 šūnās un mata folikulā – $1188811,8$ kopijas/ 10^6 šūnās. Turklāt, tā paša pacienta mātes mata folikulā HHV-7 slodze bija $2591031,6$ kopijas/ 10^6 šūnās.

2.4.3. HHV-7 saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem

ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība un persistentas HHV-7 infekcijas (latentā un aktīvā fāzē) marķieru klātbūtne pacientiem ar ME/CFS ir apkopti 2.3. tabulā.

2.3. tabula

ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju latentā un aktīvā fāzē

Simptomi	Latenta HHV-7, n (%)	Aktīva HHV-7, n (%)	P vērtība
Hronisks nogurums > 6 mēnešus	116 (100%)	68 (100%)	> 0,9999
Vārgums pēc piepūles	68 (58,6%)	40 (58,8%)	> 0,9999
Atmiņas traucējumi	79 (68,1%)	44 (64,7%)	0,7458
Samazināta koncentrēšanās	79 (68,1%)	50 (73,5%)	0,5059
Miega traucējumi	78 (67,2%)	53 (77,9%)	0,1325
Subfebrilitāte	64 (55,2%)	42 (61,8%)	0,4406
Limfadenopātija	63 (54,3%)	31 (45,6%)	0,2864
Muskuļu sāpes	67 (57,8%)	32 (47,1%)	0,1711
Locītavu sāpes	55 (47,4%)	30 (44,1%)	0,7596
Jauna tipa galvassāpes	51 (44%)	27 (39,7%)	0,6437

2.4.4. Citokīnu līmenis HHV-7 infekcijas gadījumā

Mediānas (IQR) koncentrācija (pg/ml) un procentuālais pacientu daudzums ar paaugstinātu iekaisuma un pretiekaisuma (IL-6, TNF- α , IL-12 un IL-4, IL-10) citokīnu līmeni pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju latentā un aktīvā fāzē parādīti 2.4. tabulā.

2.4. tabula

Citokīnu līmenis ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju latentā un aktīvā fāzē

Novērtētie parametri \ Citokīns, jutība	IL-6, 0,92 pg/ml	TNF- α , < 1 pg/ml	IL-4, < 2 pg/ml	IL-10, < 1 pg/ml	IL-12 (p70), 2,1 pg/ml
Persistenta HHV-7 infekcija latentā fāzē					
Mediāna (IQR)	2,9 (5,2–1,5)	55,7 (125,6–32,8)	< 2	12,5 (30–6,3)	14,2 (16,4–8,2)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	30,7	65,2	0,0	83,5	100,0
Persistenta HHV-7 infekcija aktīvā fāzē					
Mediāna (IQR)	4,6 (6,5–2)	57,5 (120,8–36,5)	< 2	20,0 (50–10,4)	15,3 (17,7–12,7)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	37,3	83,6	0,0	73,9	95,3
Manna–Vitnija tests [latentā vs aktīvā infekcija (pg/ml)]	0,131	0,4814	–	*0,0421	0,1071
Fišera eksaktais tests [paaugstināts citokīnu līmenis latentā vs aktīvā infekcija (pacientu skaits)]	0,4145	*0,0096	> 0,9999	0,1841	0,1044

* statistiski būtisks ($p < 0,05$)

– nenosakāms

2.5. B19V iesaiste ME/CFS attīstībā

2.5.1. B19V specifisku antivielu klātbūtne

B19V specifiskas IgG klases antivielas asins plazmas paraugos atrada 70% (140/200) no pacientiem ar ME/CFS un 67,4% (60/89) no analizētajiem praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,6803$). Nevienam no praktiski veseliem indivīdiem nebija B19V specifiskas IgM klases antivielas, taču 8% (16/200) no pacientiem ar ME/CFS bija IgM klases antivielas ($p = 0,0038$).

2.5.2. B19V genoma secību biežums

Lietojot nPĶR B19V genoma secības detektēja 29% (58/200) ME/CFS pacientu un 3.8% (4/104) praktiski veselo indivīdu DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm un/vai asins plazmas ($p < 0,0001$). B19V genoma secības klātbūtni DNS no perifēro asiņu leukocītiem atrada 12% (24/200) no pacientiem ar ME/CFS un 1,9% (2/104) no praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,002$). Taču, genoma secības klātbūtni DNS no asins plazmas konstatēja 17% (34/200) no pacientiem ar ME/CFS un 1,9% (2/104) no praktiski veseliem indivīdiem ($p < 0,0001$). B19V NS1 gēna ekspresiju PBMC, lietojot RT-PĶR, konstatēja 25 no 58 analizētajiem ME/CFS pacientiem, kas iepriekš bija nPĶR pozitīvi.

2.5.3. B19V slodze

Deviņiem no 24 pacientiem ar latentu/persistentu B19V infekciju vīrusa slodze bija [mediāna (IQR)] 5,6 (27,4–0,8) kopijas/ μg DNS (37,2 kopijas/ 10^6 šūnās) un 15 pacientiem $< 0,2$ kopijām/ μg DNS. Turklāt, 11 no 34 pacientiem ar aktīvu B19V infekciju vīrusa slodze bija 38,2 (217,5–17,7) kopijas/ μg DNS (251,8 kopijas/ 10^6 šūnās) un 23 pacientiem $< 0,2$ kopijām/ μg DNS

($p = 0,0289$). Visiem praktiski veselajiem indivīdiem ar B19V infekciju vīrusa slodze bija $< 0,2$ kopijām/ μg DNS.

2.5.4. B19V antivielu spektrs

Analizējot B19V specifisko antivielu spektru 75 pacientiem ar ME/CFS (39 ar un 36 bez B19V genoma secības klātbūtnes DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm un/vai asins plazmas) un lietojot *recomLine* darba komplektu, akūtu B19V infekciju atklāja vienam pacientam, nesen pārciestu (nedēļas līdz mēneši pēc infekcijas sākuma) – 41% (16/39) no pacientiem ar B19V genoma secību un 30,6% (11/36) bez tās ($p = 0,4706$). Sen pārciestu (ilgstošu) (mēnešus līdz gadus pēc infekcijas sākuma) infekciju novēroja 56,4% (22/39) pacientiem ar un 27,8% (10/36) – bez B19V genoma secības perifērajās asinīs un/vai asins plazmā ($p = 0,0191$). B19V specifiskas antivielas nebija 41,7% (15/36) no pacientiem bez B19V genoma secības. B19V specifiskas NS1 antivielas izstrādājušās 51,3% (20/39) no analizētajiem pacientiem ar B19V genoma secības klātbūtni DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm un/vai asins plazmas.

2.5.5. B19V saistība ar ME/CFS klīniskajiem simptomiem

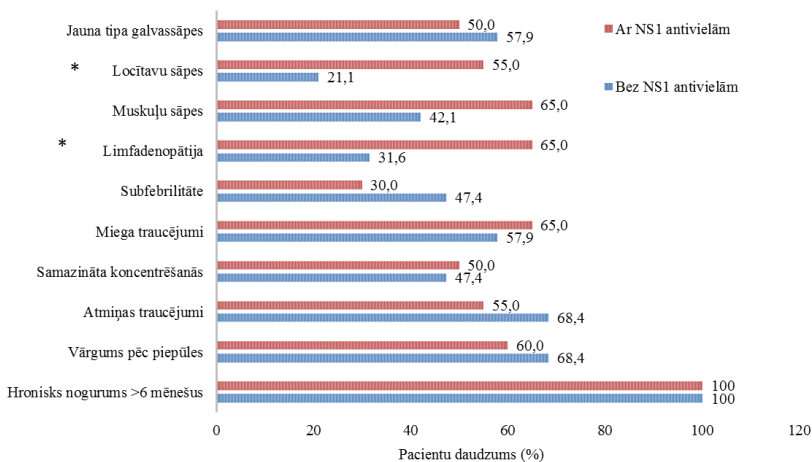
ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība un B19V infekcijas marķieru klātbūtne pacientiem ar ME/CFS apkopota 2.5. tabulā.

Pacientiem ME/CFS simptomi sākušies sešus mēnešus līdz trīs gadus pirms iekļaušanas pētījumā. No analizētajiem pacientiem ar B19V infekciju 93,3% (70/75) simptomi sākušies $8,3 \pm 1,7$ mēnešus pirms iekļaušanas pētījumā un 6,7% (5/75) no pacientiem simptomi sākušies pirms $2,4 \pm 0,5$ gadiem. Pacientiem ar nesen pārciestu B19V infekciju simptomi sākušies pirms $8,3 \pm 1,6$ mēnešiem un pacientiem ar ilgstošu infekciju – pirms $12,1 \pm 7,8$ mēnešiem (25% no tiem – vairāk kā pirms 12 mēnešiem).

**ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība ME/CFS pacientiem ar
latentu/persistentu un aktīvu B19V infekciju**

Simptomi	Latenta/persistenta B19V, n (%)	Aktīva B19V, n (%)	P vērtība
Hronisks nogurums > 6 mēnešus	24 (100%)	34 (100%)	1,0000
Vārgums pēc piepūles	15 (62,5%)	18 (52,9%)	0,5923
Atmiņas traucējumi	12 (50%)	24 (70,6%)	0,1694
Samazināta koncentrēšanās	13 (54,2%)	18 (52,9%)	1,0000
Miega traucējumi	15 (62,5%)	22 (64,7%)	1,0000
Subfebrilitāte	9 (37,5%)	20 (58,8%)	0,1820
Limfadenopātija	10 (41,7%)	17 (50%)	0,5992
Muskuļu sāpes	14 (58,3%)	16 (47,1%)	0,4351
Locītavu sāpes	9 (37,5%)	15 (44,1%)	0,7872
Jauna tipa galvassāpes	14 (58,3%)	13 (38,2%)	0,1828

2.1. attēlā redzams ME/CFS tipisko klīnisko simptomu procentuālais sadalījums analizētajiem pacientiem ar un bez detektējamām NS1 antivielām, kam konstatēta B19V genoma secības klātbūtne DNS no pilnām asinīm. No tiem locītavu sāpes bija 55% no pacientiem ar un 21,1% no pacientiem bez NS1 antivielām ($p = 0,0294$). Muskuļu sāpes novēroja 65% un 42,1%, kamēr limfadenopātiju – 65% no pacientiem ar un 31,6% bez NS1 antivielām, attiecīgi ($p = 0,1517$ un $p = 0,0369$).



2.1. attēls. ME/CFS tipisko klīnisko simptomu daudzums pacientiem ar B19V genoma secības klātbūtni ar un bez B19V specifiskām NS1 antivielām

* statistiski būtisks ($p < 0,05$)

2.5.6. Citokīnu līmenis B19V infekcijas gadījumā

Iekaisuma (IL-6, TNF- α , un IL-12) un pretiekaisuma (IL-4 un IL-10) citokīnu mediānas (IQR) koncentrācija (pg/ml) un procentuālais pacientu daudzums ar paaugstinātu citokīnu līmeni pacientiem ar latentu/persistentu un aktīvu B19V infekciju attēloti 2.6. tabulā.

Citokīnu līmenis ME/CFS pacientiem ar latentu/persistentu un aktīvu B19V infekciju

Novērtētie parametri \ Citokīns, jutība	IL-6, 0,92 pg/ml	TNF- α , < 1 pg/ml	IL-4, < 2 pg/ml	IL-10, < 1 pg/ml	IL-12 (p70), 2,1 pg/ml
Latenta/persistenta B19V infekcija					
Mediāna (IQR)	3,0 (3–2,1)	69,9 (133–29)	< 2	11,6 (29,6–5,9)	13,8 (15,1–8,1)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	8,3	76,2	0,0	75,0	100,0
Aktīva B19V infekcija					
Mediāna (IQR)	4,5 (6–1,5)	106,4 (153–42,9)	< 2	15,8 (82,5–10)	14,9 (18,6–12,7)
Pacienti ar paaugstinātu citokīnu līmeni (%)	45,5	72,7	0,0	92,9	92,9
Manna-Vitnija tests [latenta vs aktīva infekcija (pg/ml)]	0,625	0,3581	–	0,096	0,0612
Fišera eksaktais tests [paaugstināts citokīnu līmenis latentā vs aktīvā infekcijā (pacientu skaits)]	*0,0031	> 0,9999	> 0,9999	0,1234	0,4949

* statistiski būtisks ($p < 0,05$)

– nenosakāms

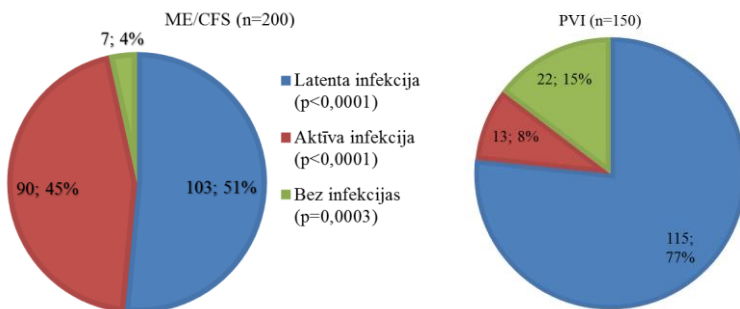
2.5.7. B19V filoģenētiskā analīze

Lai gan Latvijā ir atklāti divi B19V genotipi (genotips 1 un 2), B19V NS1 gēna filoģenētiskās analīzes rezultāti liecina par genotipa 1 cirkulāciju pacientiem ar ME/CFS. Vairums izolātu no Latvijas (arī no pacientiem ar citām diagnozēm) ietilpa genotipa 1 klasterī. Konsekvento koku topoloģiju novēroja ar *neighbour-joining* un *maximum likelihood* metodēm. Genotipa 1 gēnu daudzveidība bija zema – 0,3 ~ 1,1%.

2.6. HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas iesaiste ME/CFS attīstībā

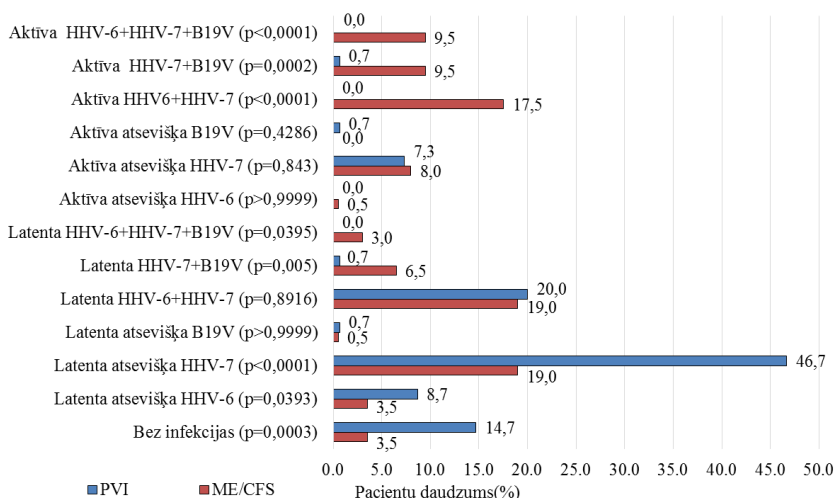
2.6.1. Vīrusu infekcijas/koinfekcijas biežums

Persistentas vīrusu infekcijas/koinfekcijas marķierus ar nPQR atrada 96,5% (193/200) no pacientiem ar ME/CFS un 85,3% (128/150) no praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,0003$) (2.2. attēls).



2.2. attēls. **Persistentas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas biežums pacientiem ar ME/CFS un praktiski veseliem indivīdiem**
PVI – praktiski veseli indivīdi

2.3. attēlā redzams persistentas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas latentās vai aktīvās fāzes marķieru biežums pacientu grupām ar ME/CFS salīdzinot ar praktiski veseliem indivīdiem.



2.3. attēls. **Persistentas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas/koinfekcijas biežums latentā vai aktīvā fāzē (%)**

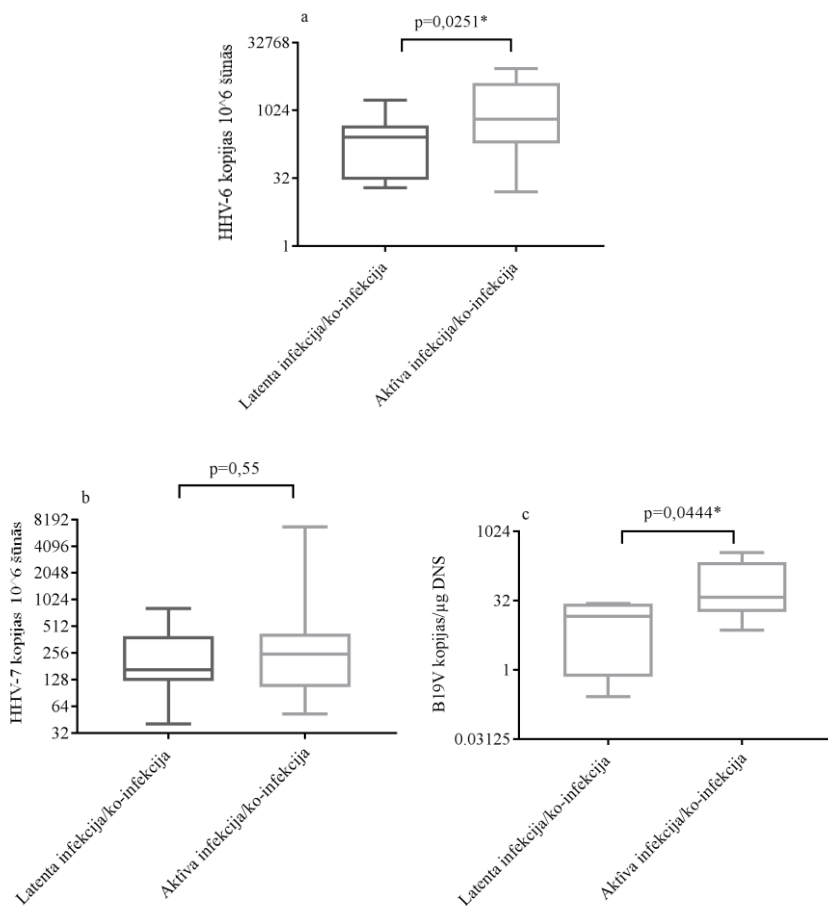
HHV-cilvēka herpesvīruss, B19V – cilvēka parvovīruss B19,
PVI – praktiski veseli indivīdi

2.6.2. Vīrusu slodze pacientiem ar koinfekciju

HHV-6 slodze pacientiem ar persistentu infekciju/koinfekciju latentā fāzē bija [mediāna (IQR)] 262 (474–29,7) kopijas/10⁶ šūnās, taču aktīvā fāzē – 653,2 (4136–190,5) kopijas/10⁶ šūnās (p = 0,0251) (2.4.a. attēls).

HHV-7 slodze bija 166,5 (398,6–123,8) kopijas/10⁶ šūnās pacientiem ar persistentu infekciju/koinfekciju latentā fāzē un 248,5 (422–105,6) kopijas/10⁶ šūnās ME/CFS pacientiem ar aktīvu infekciju (p = 0,55) (2.4.b. attēls).

Pacientiem ar persistentu infekciju/koinfekciju latentā fāzē B19V slodze bija 14,7 (27,4–0,7) kopijas/μg DNS (96,8 kopijas/10⁶ šūnās) un pacientiem ar infekciju aktīvā fāzē – 38 (217,8–18) kopijas/μg DNS (250,8 kopijas/10⁶ šūnās) (p = 0,0444) (2.4.c. attēls).



2.4. attēls. HHV-6 (a), HHV-7 (b) un B19V (c) vīrusu slodze ME/CFS pacientiem ar persistentu infekciju/koinfekciju latentā un aktīvā fāzē
 * statistiski būtisks ($p < 0,05$)

2.6.3. Citokīnu līmenis ME/CFS pacientiem ar vīrusu infekciju/koinfekciju

Saskaņā ar citokīnu līmeņa detektēšanas protokoliem, vidējais (diapazons) IL-6 līmenis praktiski veseliem indivīdiem bija 6,4 ($< 0,92$ –13) pg/ml. Pacientiem ar persistentu HHV-6/HHV-7/B19V infekciju un/vai koinfekciju latentā fāzē IL-6 līmenis bija [mediāna (IQR)] 2,5 (5,1–1,9) pg/ml un pacientiem ar persistentu atsevišķu HHV-6 vai HHV-7 infekciju aktīvā fāzē – 4,2 (5,3–1,3) pg/ml. Persistentas dubultas (HHV-6+HHV-7 un HHV-7+B19V) koinfekcijas aktīvā fāzē gadījumā IL-6 līmenis bija 4,7 (10,2–2) pg/ml un persistentas trīskāršas (HHV-6+HHV-7+B19V) infekcijas aktīvā fāzē – 3,3 (6–1,8) pg/ml. Visiem ME/CFS pacientiem bez infekcijas IL-6 līmenis bija $< 0,92$ pg/ml ($p = 0,1289$).

TNF- α līmenis praktiski veseliem indivīdiem bija zem detektēšanas līmeņa ($< 2,3$ pg/ml). ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-6/HHV-7/B19V infekciju un/vai koinfekciju latentā fāzē mediānas (IQR) TNF- α līmenis bija 59 (133–29) pg/ml un ar atsevišķu HHV-6 vai HHV-7 infekciju aktīvā fāzē – 44 (68–26,5) pg/ml. Pacientiem ar persistentu dubultu (HHV-6+HHV-7 un HHV-7+B19V) infekciju aktīvā fāzē TNF- α līmenis bija 62,5 (117,2–43) pg/ml, taču ar persistentu trīskāršu (HHV-6+HHV-7+B19V) infekciju aktīvā fāzē – 123 (178–74,7) pg/ml. ME/CFS pacientiem bez infekcijas TNF- α līmenis bija 59 (77,5–12) pg/ml ($p = 0,0492$).

IL-12 līmenis praktiski veseliem indivīdiem bija zem detektēšanas līmeņa ($< 2,1$ pg/ml). ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-6/HHV-7/B19V infekciju un/vai ko-infekciju latentā fāzē mediānas IL-12 līmenis bija 13,4 (15,6–5,6) pg/ml. Pacientiem ar persistenu atsevišķu (HHV-6 vai HHV-7) infekciju aktīvā fāzē un ar dubultu (HHV-6+HHV-7 un HHV-7+B19V) infekciju aktīvā fāzē IL-12 līmenis bija 15,5 (16,8–13,3) pg/ml un 15,5 (18,4–13,3) pg/ml, attiecīgi. Persistentas trīskāršas (HHV-6+HHV-7+B19V)

infekcijas aktīvā fāzē gadījumā IL-12 līmenis bija 16 (31,3–13,9) pg/ml un pacientiem bez infekcijas – 14,6 (15,1–3,1) pg/ml ($p = 0,0063$).

Praktiski veseliem indivīdiem vidējais IL-10 līmenis bija 10,3 (8,1–12,5) pg/ml. Mediānas (IQR) IL-10 līmenis ME/CFS pacientiem ar persistentu HHV-6/HHV-7/B19V infekciju un/vai koinfekciju latentā fāzē bija 12,4 (30–7) pg/ml, taču pacientiem ar persistentu atsevišķu (HHV-6 vai HHV-7) infekciju aktīvā fāzē – 20 (25–18,3) pg/ml. Turklāt, ME/CFS pacientiem ar persistentu dubultu (HHV-6+HHV-7 un HHV-7+B19V) un trīskāršu (HHV-6+HHV-7+B19V) infekciju aktīvā fāzē IL-10 līmenis bija 21 (98,8–10,3) un 22 (130–12,2) pg/ml, attiecīgi. Pacientiem bez infekcijas mediānas IL-10 līmenis bija 5 (11,6–3,1) pg/ml ($p = 0,0023$).

2.6.4. ME/CFS tipiskie klīniskie simptomi pacientiem ar infekciju/koinfekciju

ME/CFS klīniskie simptomi persistentas atsevišķas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas un koinfekcijas (dubultas HHV6+HHV-7, HHV-7+B19V un trīskāršas HHV-6+HHV-7+B19V) latentā un aktīvā fāzē gadījumā ar p vērtību (Fišera eksaktais tests) ir attēloti 2.7. tabulā.

**ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamība ME/CFS pacientiem ar
persistentu HHV-6, HHV-7 un B19V infekciju/koinfekciju latentā un
aktīvā fāzē**

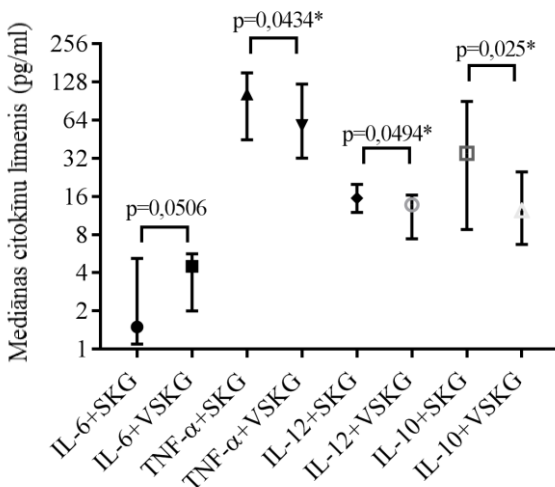
Infekcijas fāze \ Simptomi	hronisks nogurums >6 mēnešus	vārgums pēc piepūles	atmiņas traucējumi	samazināta koncentrēšanās	miega traucējumi	subfebrilitāte	limfadenopātija	muskuļu sāpes	locītavu sāpes	jauna tipa galvassāpes
Latenta at- sevišķa	100	52,2	76,1	80,4	76,1	47,8	56,5	52,2	60,9	45,7
Aktīva at- sevišķa	100	52,9	58,8	82,4	76,5	70,6	41,2	52,9	29,4	35,3
p vērtība	> 0,99 99	> 0,99 99	0,21 58	> 0,99 99	> 0,99 99	0,15 57	0,39 5	> 0,99 99	*0,0 452	0,57 08
Latenta dubulta	100	62,7	66,7	66,7	64,7	58,8	58,8	58,8	39,2	37,3
Aktīva dubulta	100	50,0	70,4	72,2	70,4	64,8	46,3	48,1	48,1	46,3
p vērtība	> 0,99 99	0,23 85	0,83 37	0,67 18	0,67 68	0,55 25	0,24 24	0,32 94	0,43 23	0,42 95
Latenta trīs- kāŗša	100	66,7	50	66,7	83,3	33,3	33,3	66,7	16,7	100
Aktīva trīs- kāŗša	100	78,9	57,9	47,4	78,9	47,4	52,6	52,6	47,4	31,6
p vērtība	> 0,99 99	0,60 61	> 0,99 99	0,64 47	> 0,99 99	0,66 09	0,64 47	0,66 09	0,34 49	*0,0 052

* statistiski būtisks ($p < 0,05$)

2.6.5. ME/CFS smagums pacientiem ar infekciju/koinfekciju

Smagu slimības gaitu pieredzēja 18,7% un vidēji smagu – 81,3% no pacientiem ar ME/CFS ($p < 0,0001$).

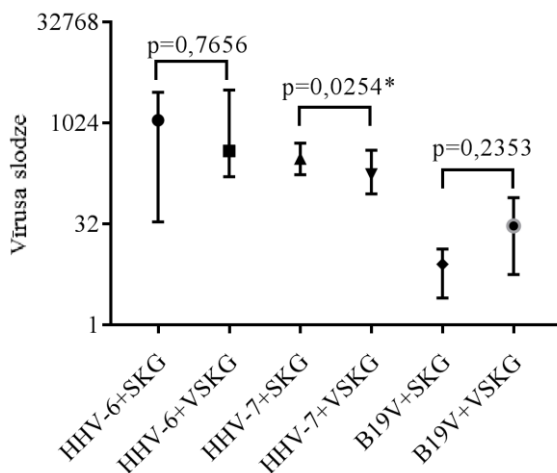
Pacientiem ar smagu un vidēji smagu ME/CFS mediānas (IQR) IL-6 līmenis bija 1,5 (5,2–1,1) pg/ml un 4,5 (5,7–2) pg/ml, attiecīgi ($p = 0,0506$). TNF- α līmenis bija 103 (150,7–44,7) pg/ml pacientiem ar smagu un 58 (123–32) pg/ml ar vidēji smagu ME/CFS ($p = 0,0434$). Pacientiem ar smagu ME/CFS slimības gaitu IL-12 līmenis bija 19,9 (37,3–15,5) pg/ml un ar vidēji smagu gaitu – 13,8 (16,4 –7,4) pg/ml ($p = 0,0494$). Turklāt, IL-10 līmenis bija 35 (90–8,8) pg/ml smaga un 12,4 (25–6,7) pg/ml vidēji smaga ME/CFS gadījumā ($p = 0,025$) (2.5. attēls).



2.5. attēls. **Mediānas (IQR) IL-6, TNF- α , IL-10 un IL-12 līmenis ME/CFS pacientiem ar smagu un vidēji smagu slimības gaitu**

* statistiski būtisks, SKG – smaga klīniskā gaita, VSKG – vidēji smaga klīniskā gaita

HHV-6 slodze ME/CFS pacientiem ar smagu slimības gaitu bija mediāna (IQR) 1134 (2962–34,5) kopijas/ 10^6 šūnās un ar vidēji smagu gaitu – 391,8 (3190–162,8) kopijas/ 10^6 šūnās ($p = 0,7656$). Taču, HHV-7 slodze pacientiem ar smagu ME/CFS bija 303,6 (514,8–174) kopijas/ 10^6 šūnās un ar vidēji smagu slimības gaitu – 175,7 (402,7–90) kopijas/ 10^6 šūnās ($p = 0,0254$), bet B19V slodze smaga un vidēji smaga ME/CFS gadījumā bija 8 (13,5–2,5) kopijas/ μg DNS (53 kopijas/ 10^6 šūnās) un 30 (79,1–5,6) kopijas/ μg DNS (197,8 kopijas/ 10^6 šūnās), attiecīgi ($p = 0,2353$) (2.6. attēls).



2.6. attēls. **Mediānas (IQR) HHV-6, HHV-7 (kopijas/ 10^6 šūnās) un B19V (kopijas/ μg DNS) slodze ME/CFS pacientiem ar smagu un vidēji smagu slimības gaitu**

* statistiski būtisks, SKG – smaga klīniskā gaita, VSKG – vidēji smaga klīniskā gaita

3. DISKUSIJA

ME/CFS ir multifaktoriāla slimība, ko raksturo vairāki simptomi, kas bieži seko pēc vīrusa infekcijas vai ilgstoša stresa. Pēc vairākas desmitgades ilgušiem pētījumiem, joprojām nav vienprātības par imūnsistēmas traucējumu biežumu un smagumu šajā stāvoklī (*Bansal et al.*, 2012; *Committee on the Diagnostic Criteria for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome et al.*, 2015). ME/CFS ir atzīta par heterogēnu slimību ar homeostāzes trūkumu vairākās orgānu sistēmās, ko pavada psihosociālas problēmas, kas samazina dzīves kvalitāti (*Winger et al.*, 2015; *Glassford*, 2017).

Vīrusu infekcijas uzskata par vienu no potenciālajiem ME/CFS palaidējfaktoriem, jo pēkšņa slimības aizsākuma gadījumā daudziem pacientiem ar ME/CFS sastopami infekcijai līdzīgi simptomi. Nogurums var būt pēc-infekcijas sekas un vīrusa infekcija var izraisīt vai veicināt imunoloģisko disfunkciju pacientiem ar ME/CFS. Tomēr, nepastāv vienprātība par vīrusa infekcijas iesaisti ME/CFS (*Morinet and Corruble*, 2012). Nav skaidrs, vai aktīva HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 un B19V izraisa ME/CFS vai seko šai slimībai.

Šajā pētījumā bioloģiskais materiāls no 200 pacientiem ar klīniski diagnosticētu ME/CFS un 150 praktiski veseliem indivīdiem analizēts ar molekulārajām un seroloģijas laboratorijas metodēm, lai noteiktu HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, B19V un XMRV klātbūtni, slodzi un aktivitātes fāzi, kā arī citokīnu līmeni saistībā ar klīniskajiem simptomiem.

ME/CFS ir vairāk izplatīts sievietēm, nekā vīriešiem vidū. Ziņots, ka 65 līdz 80% no pieaugušo ME/CFS gadījumiem sastāda sievietes (*Underhill*, 2015). Līdzīgi, šajā pētījumā 65% no pacientiem ar ME/CFS ir sievietes, kaut gan ME/CFS izplatība varētu būt augstāka, nekā pašlaik noteikts. ME/CFS var sākties jebkurā vecumā, taču biežākā saslimstība novērota 10 līdz 19 un 30 līdz

39 gadu vecumā (*Bakken et al.*, 2014). Tas atbilst šajā pētījumā iekļauto pacientu vidējam vecumam (38 ± 12 gadi).

XMRV tika uzskatīta par iespējamo ME/CFS izraisīto faktoru kopš 2009. gada, kad parādījās ziņojums par XMRV pozitīviem 67% no ME/CFS pacientiem un 3,7% no veselīgiem donoriem (*Lombardi et al.*, 2009). Nākamā gada publikācijā atklātas peļu leikozes vīrusam radniecīga vīrusa gēnu secības 86,5% no ME/CFS pacientiem un 6,8% no kontroles grupas indivīdiem (*Lo et al.*, 2010). Taču, minētie ziņojumi ir pretrunā ar šī pētījuma rezultātiem, kur XMRV specifiskās *gag* un *env* gēnu secības nav atrastas no perifērajām asinīm izolētos DNS paraugos gan pacientiem ar ME/CFS, gan praktiski veselīgiem indivīdiem. Iegūtie rezultāti sakrīt ar vairums citu publicēto pētījumu pasaulē, kur XMRV pacientiem ar ME/CFS netiek atrasts un ir secināts, ka šim vīrusam nav saistība ar cilvēku slimībām (*Groom and Bishop*, 2012).

ME/CFS etioloģijas palaidējfaktors varētu atšķirties no izraisīto faktora un pētnieks *Underhill* 2015. gadā diskutē, ka drīzāk radniecīgi, nekā atšķirīgi patogēni varētu izraisīt šo slimību (*Underhill*, 2015).

Vīrusspecifisko IgG klases antivielu klātbūtne novērota pacientiem pēc infekcijas, taču vīrusspecifiskās IgM klases antivielas un vīrusa genoma secību klātbūtni DNS paraugos, kas izolēti no šūnām brīvas asins plazmas, atrod tikai akūtas vai primāras infekcijas un aktīvas infekcijas laikā (*Liefeldt et al.*, 2005). Ņemot vērā, ka primārā inficēšanās ar šiem vīrusiem parasti notiek agrā bērnībā, vīrusa genoma secību atrade DNS paraugos, kas izdalīti no picaugušo, kuriem konstatēta persistenta vīrusa infekcija, šūnām brīvas asins plazmas, ir vīrusa reaktivācijas marķieris. To pavadā detektējama attiecīgā vīrusa genoma secību klātbūtne DNS, kas izolēta no pilnām perifērajām asinīm vai asiņu leikocītiem, tādējādi liecinot par persistentu vīrusa infekciju (*Traylen et al.*, 2011).

Šajā pētījumā B19V specifisku IgG klases antivielu biežums ir līdzīgs pacientiem ar ME/CFS (70%) un praktiski veselīgiem indivīdiem (67,4%)

($p = 0,6803$). Turklāt, nevienam no praktiski veseliem indivīdiem, bet 8% no pacientiem ar ME/CFS ir atrastas IgM klases antivielas ($p = 0,0038$). Citos B19V seroprevalences pētījumos arī nav atrastas būtiskas atšķirības starp B19V specifisku IgG klases antivielu atradni pacientiem un kontroles grupai, ziņojot, ka B19V seroprevalence populācijā variē no 60% līdz 80%, savukārt citi B19V specifiskās IgG klases antivielas atrod 74% un IgM – vienam pacientam ar ME/CFS (*Cooling et al.*, 1995; *Zhang et al.*, 2010). Ņemot vērā, ka B19V seroprevalence pieaug no 2% – bērniem līdz piecu gadu vecumam līdz 85% vecāku cilvēku vidū (*Servant-Delmas et al.*, 2010) un vidējais šī pētījuma grupas vecums ir 38 ± 12 gadi, IgG klases antivielu sastopamības biežuma rezultāti atbilst pasaules populācijas datiem.

B19V NS1 specifisku antivielu klātbūtne, ko pavadā B19V DNS klātbūtne, atrodama 20/39 (51,3%) analizētajiem pacientiem ar ME/CFS, liecinot par B19V infekcijas persistenci. Šie rezultāti sakrīt ar *Kerr et al.* publicēto, kur IgG klases antivielas pret NS1 proteīnu detektē vairāk pacientiem (41,5%) nekā kontroles grupas indivīdiem (7%), turpretim IgM klases antivielas atrod trim pacientiem un vienam donoram. B19V specifisku NS1 antivielu klātbūtne norāda uz smagu un persistentu infekciju, tādējādi daļai pacientu imūnsistēma nespēj pietiekami kontrolēt vīrusu (*von Poblitzki et al.*, 1995; *Kerr et al.*, 2010).

Šajā pētījumā B19V genoma secības biežāk atrod pacientiem ar ME/CFS (29%) nekā praktiski veseliem indivīdiem (3,8%) ($p < 0,0001$). Latentas/persistentas B19V infekcijas (vīrusa genoma secība tikai DNS no leukocītiem) sastopamībā atklātas būtiskas atšķirības starp pacientiem (12%) un praktiski veseliem indivīdiem (1,9%) ($p = 0,002$). Arī aktīvu B19V infekciju (B19V genoma secība arī no šūnām brīvas asins plazmas DNS paraugos) būtiski vairāk detektē pacientiem ar ME/CFS (17%) nekā praktiski veseliem indivīdiem (1,9%) ($p < 0,0001$). Turklāt, B19V replikācija ir pierādīta pacientiem ar persistentu B19V infekciju, detektējot NS1 gēna ekspresiju

pacientu PBMC. Citos pētījumos arī ziņo par B19V DNS, matricēs ribonukleīnskābes (mRNS) un proteīnu detektēšanu makrofāgos, T un B šūnās, folikulārās dendrītšūnās un monocītos (*Takahashi et al.*, 1998), taču B19V infekcija monocītu šūnu līnijā U937 ir neveiksmīga, jo vīrusa replikācija nenotiek un vīrus daļiņas netiek producētas (*Munakata et al.*, 2006).

Mūsu pētījuma rezultāti ir saskaņā ar citu pētnieku publicētajiem datiem, kas secina, ka vismaz daļai ME/CFS pacientu B19V varētu būt iesaistīts slimības etiopatogēnēzē, jo B19V infekcijas marķieri ir detektēti 40% no ME/CFS pacientiem un tikai 15% no kontroles grupas indivīdiem (*Fremont et al.*, 2009). Šajā pētījumā paaugstināta B19V slodze būtiski biežāk ir noteikta pacientiem ar ME/CFS nekā praktiski veseliem indivīdiem ($p = 0,0003$). Turklāt, aktīvas B19V infekcijas gadījumā vīrusa slodze ir augstāka nekā latentas/persistentas B19V infekcijas gadījumā. Citu autoru publikācijās parādīts, ka ar reālā-laika PĶR B19V genoma secības konstatē tikai pacientiem ar ME/CFS, bet ne kontroles grupas indivīdiem (*Kerr et al.*, 2010). Savukārt daļa pētnieku ziņo, ka B19V infekcija nav saistīta ar ME/CFS, jo B19V infekcijas marķieri nav atrasti visos ME/CFS gadījumos (*Sanders and Korf*, 2008). Turklāt, B19V infekcijas neiroloģisko aspektu pārskatā, deviņi ziņojumi liecina par korelāciju starp ME/CFS un akūtu B19V infekciju, tomēr divi ziņojumi to noliedz (*Barah et al.*, 2014).

Analizējot B19V IgG un IgM klases antivielu spektru, akūta infekcija atklāta tikai vienam no pacientiem ar ME/CFS. Nesen pārciesta infekcija novērota vairāk pacientiem ar nPĶR detektētu B19V genoma secības klātbūtni (41%) nekā bez tās (30,6%), taču bez statistiskās ticamības ($p = 0,4706$). Turklāt, ilgstošu infekciju būtiski biežāk atrod pacientiem ar (56,4%) nekā bez (27,8%) B19V genoma secības klātbūtnes DNS, kas izdalīta no pilnām asinīm ($p = 0,0191$).

Šī pētījuma dati liecina, ka B19V infekcija var persistēt gadiem. Pacientiem ar nesen pārciestu B19V infekciju ME/CFS simptomi sākušies

pirms $8,3 \pm 1,6$ mēnešiem un ar ilgstošu infekciju – pirms $12,1 \pm 7,8$ mēnešiem, norādot, ka B19V infekcija ir iespējamais slimības veicinātājs. Turklāt, smagu ME/CFS klīnisko gaitu piedzīvo vairāk pacienti ar ilgstošu (28,1%) nekā ar nesen pārcietu B19V infekciju (18,5%), norādot uz pakāpenisku simptomu smaguma pieaugumu infekcijas laikā.

B19V infekcijas atrade ME/CFS gadījumos tiecas apstiprināt hipotēzi par B19V kā iespējamo slimības aktivizētāju, taču dažādi faktori norāda, ka vīrusu infekcija var izraisīt ME/CFS un atsevišķi infekciozie aģenti var veicināt slimības apakšgrupas izveidošanu (*Kerr et al.*, 2010). Taču līdz šim nav atrasti specifiski slimību izraisošie patogēni, kas drīzāk varētu būt vīrusi nevis baktērijas antibiotiku terapijas neefektivitātes dēļ (*Underhill*, 2015).

Mūsu pētījumā atklāta 92,1% HHV-6 seropozitivitāte pacientiem ar ME/CFS un 76,7% seropozitivitāte praktiski veseliem indivīdiem, parādot atšķirību starp šīm grupām. Taču, IgM klases antivielas atrod 6,1% no pacientiem un tikai 2,2% kontrolēm ($p = 0,2227$). Citu pētnieku publicētie rezultāti par HHV-6 antivielu izplatību ir pretrunīgi. Daļa ziņo par biežāku IgM klases antivielu sastopamību pacientiem ar ME/CFS (50%) salīdzinot ar donoriem (28,5%), kamēr daži neatrod atšķirības starp pacientu un kontroles grupām (*Levine et al.*, 2001; *Burbelo et al.*, 2012). Par spīti iespējamajām atšķirībām ģeogrāfiskajā novietojumā, HHV-6 IgG klases antivielu biežums šī pētījuma praktiski veseliem indivīdiem (76,7%) atbilst iepriekš publicētajam Grieķijā (78,8%), ko neietekmē pieaugušo vecums un dzimums (*Politou et al.*, 2014). Taču, *Ablashi* ar kolēģiem IgM klases antivielas ME/CFS pacientiem (57,1%) un donoriem (16%) atrod biežāk, nekā mūsu pētījumā (6,1% un 2,2%, attiecīgi) (*Ablashi et al.*, 2000), kas iespējams ir saistīts ar pielietotās testsistēmas jutības atšķirībām.

Saskaņā ar PĶR rezultātiem, persistentu HHV-6 infekciju latentā fāzē novēro vairāk pacientiem ar ME/CFS nekā praktiski veseliem indivīdiem (42% vs 28,7%, $p = 0,0133$). Turklāt, persistentu HHV-6 infekciju aktīvā fāzē atrod

tikai pacientiem ar ME/CFS (11%) un nevienam no donoriem ($p < 0,0001$). Līdzīgi šī pētījuma rezultātiem, *Di Luca* ar kolēģiem atrod HHV-6 genoma secības 44% no pacientiem un 29% no donoriem (*Di Luca et al.*, 1995). Analizējot lielāku kohortu, tiek ziņots par HHV-6 klātbūtni 70% pacientiem un 20% kontrolēm (*Buchwald et al.*, 1992). Turklāt, 30,5% no pacientiem un 9% no donoriem ir aktīva HHV-6 infekcija (*Nicolson et al.*, 2003). Publikācijas rāda korelāciju starp aktīvu HHV-6 replikāciju un ME/CFS, kas var veidoties latentas vīrusa infekcijas reaktivācijas rezultātā (*Buchwald et al.*, 1992; *Sairenji et al.*, 1995; *Ablashi et al.*, 2000). Tomēr, citos pētījumos neatrod HHV-6 sastopamības atšķirības starp pacientiem un kontroles grupu (*Wallace et al.*, 1999; *Reeves et al.*, 2000; *Cameron et al.*, 2010). Svarīgs ir fakts, ka dažu pētījumu kohortas ir pārāk mazas, lai izdarītu vispārīgus secinājumus par vīrusa infekcijas saistību ar ME/CFS. Mūsu pētījumā HHV-6A ir atrasts vienam pacientam ar ME/CFS, parādot HHV-6B izplatību ME/CFS pacientu vidū Latvijā. Līdzīgi, citā pētījumā HHV-6B klātbūtne pacientiem ar ME/CFS ir biežāka (75%) nekā HHV-6A (9,7%) (*Burbelo et al.*, 2012). Citos pētījumos iegūtie dati ir pretēji un HHV-6A ir vairāk izplatīts pacientiem ar ME/CFS, bet HHV-6B – kontrolēm (*Di Luca et al.*, 1995; *Ablashi et al.*, 2000). Šīs atšķirības var būt izskaidrojamas ar ģeogrāfisko novietojumu, jo arī citā pētījumā par HHV-6 saistību ar autoimūno tiroidītu Latvijā arī ir konstatēta HHV-6B prevalence (*Sultanova et al.*, 2017).

Pēc inficēšanās ar HHV-6, pirmā notiek nekavējoši agrīno (IE) gēnu transkripcija. IE U89/90 α -gēns ir ekspresēts 78% no analizētajiem pacientiem ar HHV-6 klātbūtni, liecinot par HHV-6 transkripciju, kā arī šūnas optimizēšanu vīrusa gēnu ekspresijai un replikācijai šiem ME/CFS pacientiem (*Mirandola et al.*, 1998; *De Bolle et al.*, 2005). Tomēr, specifiskas mRNS detekcija ne vienmēr ir jaunu proteīnu sintēzes marķieris un transkriptu uzkrāšana var notikt pirms tās (*Mirandola et al.*, 1998). Turklāt, mRNS

nedetekstē visos gadījumos, savukārt replikācija iespējama ne tikai PBMC, bet arī limfocītajos audos vai citos orgānos (*Van den Bosch et al.*, 2001).

HHV-6 reaktivācija un replikācija šiem pacientiem ar ME/CFS ir pierādīta ar HHV-6 agrīno un vēlīno proteīnu konstatēšanu ar vīrusspecifiskām monoklonālajām antivielām. Mūsu pētījumā, analizējot PBMC no 36 pacientiem, sešiem ir atrasta agrīnā p41 antigēna ekspresija. Tāpat, ir identificēta HHV-6B reaktivācija, konstatējot HHV-6B specifisku gp100 ekspresiju 15 pacientiem ar ME/CFS. Vēl septiņiem pacientiem ar ME/CFS, lietojot antivielas, kas reaģē ar HHV-6A un HHV-6B, ir atrasta ar vīrusa replikāciju saistītā gp116 ekspresija (*De Bolle et al.*, 2005).

Vīrusa kopiju daudzuma analīze ar reālā-laika PĶR atklāj, ka HHV-6 slodze ir gandrīz septiņas reizes augstāka pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju aktīvā, nekā latentā fāzē ($p = 0,0019$). Paaugstinātas vīrusa slodzes klātbūtne visiem pacientiem ar persistentu HHV-6 infekciju aktīvā fāzē, kā arī būtiski augstāka vīrusa slodze pacientiem ar aktīvu infekciju, liecina, ka paaugstinātu vīrusa slodzi var izmantot kā marķieri latentas un aktīvas infekcijas fāzes izšķiršanai.

Aktīvas infekcijas laikā vīruss replicējas slidošā apla (*rolling circle*) mehānismā un uztur vīrusa genomu kā cirkulāru episomu. Dažiem pacientiem ar slimībām, kas saistītas ar HHV-6 infekciju, ir ļoti augsta vīrusa slodze, kas drīzāk liecina par hromosomāli integrējušos HHV-6, nevis par augstu vīrusa replikācijas līmeni. Tāpēc pacienta ārstēšanā un slimības saistīšanā ar vīrusa infekciju būtiski ir atšķirt aktīvu vīrusa infekciju no integrācijas (*Clark*, 2016). Telomēru atkārtojumi HHV-6 genoma galos ļauj HHV-6 integrēties saimniekšūnas telomēros homologās rekombinācijas laikā (*Kaufer and Flamand*, 2014). Integrācija dzimumšūnās var tikt nodota pēcnācējam, tādējādi vīruss integrējas specifiskās hromosomās katrā kodolu saturošajā šūnā (*Gravel et al.*, 2015). Šūnu kultūrās pierādīts, ka dzimumšūnās integrējies HHV-6 var aktivēties pārnesamas infekcijas formā (*Prusty et al.*, 2013 b) un pacienti ar

imūndeficītu var producēt infekciozas vīrusa daļiņas (*Endo et al.*, 2014). Literatūras dati norāda, ka HHV-6 integrācijas gadījumā, vīrusa genoma kopija/s ir detektējama/s katrā ķermeņa šūnā (*Gravel et al.*, 2015). Šajā pētījumā iespējama HHV-6 hromosomālā integrācija noteikta sešiem pacientiem ar ME/CFS, jo konstatēta augsta vīrusa slodze – vairāk kā viena HHV-6 kopija katrā šūnā [mediāna (IQR) 1209033 (1464421–808183) kopijas/10⁶ šūnās].

Dr. Prusty ar kolēģiem, analizējot šūnas no pacientiem ar konstatētu HHV-7 genoma secības klātbūtni DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm, ir parādījis HHV-7 integrāciju hromosomu telomēros (*Prusty et al.*, 2017). HHV-7 hromosomālā integrācija noteikta vienam no ME/CFS pacientiem Latvijā, ar vairāk kā vienu HHV-7 kopiju šūnā (1140127,6 kopijas/10⁶ šūnās), kas ir apstiprināts ar augstu HHV-7 slodzi mata folikula šūnās (1188811,8 kopijas/10⁶ šūnās) un veikto fluorescento *in situ* hibridizācijas analīzi. HHV-7 integrācija dzimumšūnās ir apstiprināta nosakot vairāk kā divas HHV-7 kopijas pacienta mātes mata folikula šūnā (2591031,6 HHV-7 kopijas/10⁶ šūnās).

Šajā pētījumā HHV-7 specifiskas IgG klases antivielas ir konstatētas 84,6% no pacientiem ar ME/CFS un 93,8% no praktiski veselīgiem indivīdiem, kas atbilst pasaules populācijas HHV-7 seroprevalencei - aptuveni 90% (*Caselli and Di Luca*, 2007). Persistentu HHV-7 infekciju latentā fāzē līdzīgi bieži atrod pacientiem ar ME/CFS (58%) un praktiski veselīgiem indivīdiem (67,3%) ($p = 0,0766$), kamēr persistentu HHV-7 infekciju aktīvā fāzē biežāk atrod pacientiem ar ME/CFS (34%) nekā praktiski veselīgiem indivīdiem (8%) ($p < 0,0001$). Turklāt, HHV-7 U57 gēns, kas veido ikosaedrisku kapsīdu, ir ekspresēts 45,7% no analizētajiem pacientiem ar HHV-7 infekciju, norādot uz aktīvu replikāciju. Pasaules pētījumi par HHV-7 infekciju pacientiem ar ME/CFS ir ļoti trūcīgi. Daži atrod HHV-7 specifiskas antivielas 91,4% no ME/CFS pacientiem un 88% no veselām kontrolēm, bet daži visiem pacientiem ar ME/CFS un 88% no kontrolēm (*Sairenji et al.*, 1995; *Ablashi et al.*, 2000).

Pacientiem ar persistentu HHV-7 infekciju aktīvā fāzē ir augstāka vīrusa slodze, nekā pacientiem ar latentu infekciju, taču bez statistiska būtiskuma ($p = 0,3502$). *Oakes et al.* publicētie dati sakrīt ar mūsu rezultātiem – arī viņi neatrod statistiski būtiskas atšķirības HHV-7 kopiju daudzumā ME/CFS pacientu un kontroļu DNS, kas izolēta no PBMC un siekalām (*Oakes et al.*, 2013).

Nesen publicētā pētījuma dati arī atbalsta hipotēzi par herpesvīrusu iesaisti ME/CFS attīstībā, herpesvīrusu kodētā dezoksiribīna trifosfāta nukleotīdhidrolāzes – dUTPases ekspresijas dēļ, kas aktivē imūno atbildi (*Halpin et al.*, 2017). HHV-6, HHV-7 un koinfekciju procentuālais daudzums pacientiem un kontrolēm ir līdzīgs, tomēr HHV-7 infekcija konstatēta divreiz vairāk nekā HHV-6 infekcija (*Wallace et al.*, 1999). Citi autori nav nenovērojuši atšķirības HHV-6, HHV-7 un B19V sastopamībā dvīņiem ar un bez ME/CFS (*Koelle et al.*, 2002). Turklāt, *Fremont* ar kolēģiem fiksē līdzīgu daudzumu HHV-6 un HHV-7 pozitīvo gadījumu ar augstu slodzi kuņģa un zarnu gļotādas audos gan ME/CFS pacientiem, gan donoriem. Savukārt B19V infekciju šajā pašā darbā autori ir atraduši būtiski vairāk ME/CFS pacientiem, nekā kontroles grupas indivīdiem (*Fremont et al.*, 2009).

Mūsu institūtā veiktajos pētījumos ir demonstrēta HHV-6 un HHV-7 reaktivācija pacientiem ar ME/CFS (*Chapenko et al.*, 2006), ir noteikta un analizēta herpesvīrusu genoma secību klātbūtne veseliem asins donoriem Latvijā (*Kozireva et al.*, 2001) un noteikta aktīva HHV-6, HHV-7 un B19V infekcija un vienlaicīga dubulta un trīskārša šo vīrusu infekcija pacientiem ar ME/CFS (*Chapenko et al.*, 2012).

Analizējot HHV-6/HHV-7/B19V koinfekciju šajā pētījumā, persistenta infekcija/koinfekcija biežāk ir atrasta pacientiem ar ME/CFS (96,5%) nekā praktiski veseliem indivīdiem (85,3%) ($p = 0,0003$). No tiem persistenta infekcija/koinfekcija latentā fāzē ir atklāta pusei no pacientiem ar ME/CFS (51,1%) un $\frac{3}{4}$ no praktiski veseliem indivīdiem (76,7%) ($p < 0,0001$). Taču,

persistenta infekcija/koinfekcija aktīvā fāzē būtiski biežāk ir atrasta ME/CFS pacientiem (45%) nekā praktiski veseliem indivīdiem (8,7%) ($p < 0,0001$), parādot aktīvas infekcijas nozīmi ME/CFS attīstībā.

Zīmīgi, ka atsevišķa B19V infekcija ir atrasta tikai vienam pacientam un diviem praktiski veseliem indivīdiem šajā pētījuma grupā. Ņemot vērā, ka herpesvīrusi var būt palīgvīrusi parvovīrusu apakšdzimtas – dependovīrusu replikācijā, hipotētiski, tie varētu kalpot kā B19V infekcijas aktivētāji (*Streiter et al.*, 2011).

Šī pētījuma dati demonstrē līdzīgu sastopamības biežumu persistentai atsevišķai infekcijai aktīvā fāzē pacientu ar ME/CFS un praktiski veselu indivīdu vidū, taču persistenta dubulta HHV-7+B19V infekcija aktīvā fāzē ir novērota būtiski vairāk pacientiem, salīdzinot ar veseliem indivīdiem ($p = 0,0002$). Turklāt, aktīva dubulta HHV-6+HHV-7 un aktīva trīskārša koinfekcija ir atrasta tikai pacientiem ar ME/CFS ($p < 0,0001$ un $p < 0,0001$, attiecīgi), skaidri norādot uz aktīvas koinfekcijas iesaisti ME/CFS attīstībā. HHV-6 un B19V slodze ir būtiski augstāka pacientiem ar infekciju/koinfekciju aktīvā, nekā latentā fāzē ($p = 0,0251$ un $p = 0,0444$, attiecīgi). Tāpat, HHV-7 slodze ir augstāka pacientiem ar smagu, salīdzinot ar vidēji smagu ME/CFS slimības gaitu, tādējādi norādot uz šīs infekcijas saistību ar slimības simptomu smagumu ($p = 0,0254$). Citi pētnieki nav analizējuši vīrusa slodzi saistībā ar koinfekcijām, taču viņi ir atraduši līdzīgu augstākas HHV-7 izplatības un slodzes tendenci, kā arī biežāku B19V sastopamību pacientiem ar ME/CFS salīdzinot ar kontrolēm, kas liecina par B19V iesaisti ME/CFS attīstībā. Pretēji mūsu pētījumam, viņi neatrod HHV-6 klātbūtnes biežuma un slodzes atšķirības pacientiem un kontrolēm (*Fremont et al.*, 2009).

Aktīvs vīruss var būt nenosakāms vairākos pacienta ķermeņa šķidrumos, jo iespējamā latences vieta var būt citi audi, nevis perifērās asinis (*Hüfner et al.*, 2007). Tādējādi, lai gan vīrusa infekcijas klātbūtne nav konstatēta visos ME/CFS gadījumos, tā varētu veidot šīs slimības apakšgrupu. Līdzīgi,

endokrīnie, imunoloģiskie, psihosociālie, ģenētiskie faktori un faktori, kas ir predisponējoši oksidatīvajam stresam ir vērā ņemami, iedalot pacientus apakšgrupās (*Sanders and Korf, 2008*).

Pastāv hipotēzes, ka ME/CFS varētu izraisīt neirotropi vīrusi, tādi kā HHV-6 un HHV-7, kas var inficēt neironus un imūnsistēmas šūnas, bojāt CNS kapilārus un mikro-arterijas un novest pie hroniskas infekcijas. Arī imūnsupresija un aktivēti imūnie kompleksi var izraisīt hronisku iekaisumu, kas veicina persistentas infekcijas veidošanos (*Krueger and Ablashi, 2006; Broderick et al., 2010; Glassford, 2017*). Turklāt, hronisku imūnsistēmas aktivāciju pavada citokīnu produkcijas regulācijas izmaiņas (*Sairenji and Nagata, 2007*).

Citokīni ir mazi proteīni, kas iesaistīti šūnu signālu nodošanā, galvenokārt nodrošinot līdzsvaru starp humorālo un šūnu imūno atbildi. Iekaisuma citokīni nodrošina sistēmisku iekaisumu, bet pretiekaisuma citokīni – iekaisuma citokīnu inhibīciju (*Mensah et al., 2017*). Šajā pētījumā citokīnu līmeņa analīze atklāj, ka pacientiem ar ME/CFS ir paaugstināts iekaisuma (IL-6, TNF- α un IL-12) un pretiekaisuma (IL-10) citokīnu līmenis salīdzinot ar praktiski veselīgiem indivīdiem. Turklāt, ME/CFS pacientiem ar persistentu infekciju aktīvā fāzē ir augstāks citokīnu līmenis nekā pacientiem ar persistentu infekciju latentā fāzē, taču, ne visos gadījumos atšķirības ir statistiski būtiskas. Pretēji, IL-4 līmenis nav paaugstināts pacientiem ar ME/CFS, ko atbalsta arī citi pētījumi, kur neatrod IL-4 līmeņa atšķirības starp pacientiem ar ME/CFS un veselām kontrolēm (*Nakamura et al., 2010; Brenu et al., 2011; Lidbury et al., 2017*). Citi autori ir atraduši augstāku IL-4 līmeni sievietēm ar šo slimību, salīdzinot ar kontroles grupas sievietēm (*Fletcher et al., 2009*).

Pretrunas starp citokīnu līmeņa pētījumiem pacientiem ar ME/CFS izskaidro ar variācijām diagnostikas kritēriju izvēlē pacientu un kontroļu atlasē, slimības sākumu, ilgumu un slimības fāzi, kā arī parauga savākšanas laiku un

izmantotajām laboratorijas metodēm (*Mensah et al.*, 2017). Pacienti ar smagu simptomu uzliesmojumu pēc piepūles ir konstatēts vairāku citokīnu līmeņa pieaugums (*White et al.*, 2010). Turklāt ir parādīts, ka imūnsistēmas parametrus ietekmē arī vairāk kā trīs gadus ilgstoša slimība (*Hornig et al.*, 2015).

Ir pierādīts, ka HHV-6 var inficēt monocītus/makrofāģus un iekaisuma citokīni var veicināt šī vīrusa reaktivāciju no latentas fāzes (*Aoki et al.*, 2016).

Vīrusa infekcijas izraisīts ilgstošs imūnsistēmas disbalanss, ko pavada citokīnu līmeņa izmaiņas, var novest pie ME/CFS simptomu attīstības. Šī pētījuma atrades atbilst *Brenu et al.* atklājumiem par Th1/Th2 citokīnu atbildes līdzsvara trūkumu, ko ataino paaugstināts TNF- α un IL-10 līmenis, liecinot par persistentu hronisku infekciju (*Couper et al.*, 2008; *Brenu et al.*, 2011).

Lai gan IL-6 līmenis ir bieži paaugstināts pacientiem ar aktīvu atsevišķu HHV-6 un B19V infekciju, analizējot citokīnu līmeni koinfekcijas gadījumā, IL-6 līmeņa atšķirības starp pacientu grupām bez infekcijas, ar latentu infekciju/koinfekciju, aktīvu atsevišķu, dubultu un trīskāršu koinfekciju netiek atrastas ($p = 0,1289$). Taču starp iepriekš minētajām grupām ir atklātas būtiskas TNF- α , IL-12 un IL-10 līmeņa atšķirības ($p = 0,0492$, $p = 0,0063$ un $p = 0,0023$, attiecīgi). Mūsu pētījuma rezultāti ir saskaņā ar publicētajiem datiem par vienādi paaugstinātu IL-6 līmeni bez atšķirībām starp pacientu un donoru grupām (*Brenu et al.*, 2011). Citas pētnieku grupas arī nav atradušas IL-6 līmeņa atšķirības ME/CFS un kontroles gadījumu vidū (*Ter Wolbeek et al.*, 2007; *Lidbury et al.*, 2017). Turpmāka datu analīze atklāj augstāku IL-6 līmeni pacientiem ar aktīvu dubultu koinfekciju, nekā pacientiem ar latentu infekciju/koinfekciju un bez infekcijas ($p = 0,0319$ un $p = 0,0418$, attiecīgi). Neskatoties uz faktu, ka IL-6 līmenis ir tikai nedaudz paaugstināts, rezultāti ataino atšķirības starp pacientiem ar persistentu koinfekciju latentā un aktīvā fāzē, ko var novērot tikai analizējot noteiktas ME/CFS pacientu grupas ar koinfekciju. Arī citos pētījumos ir ziņots par paaugstinātu IL-6 līmeni

pacientiem ar ME/CFS (*Fletcher et al.*, 2009). Ņemot vērā, ka pētījumā iekļautajiem pacientiem ME/CFS sācies vidēji pirms $10,2 \pm 4,2$ mēnešiem, pretrunīgus rezultātus var skaidrot ar dažādo slimības ilgumu. Augsta IL-6 līmeņa atrade attiecināma uz vecākiem pacientiem, kam ME/CFS ildzis vairāk kā divus gadus, bet zema līmeņa IL-6 attiecas uz jaunākiem pacientiem ar nesen sākušos slimību (*Russell et al.*, 2016).

Īpaši augstāks TNF- α līmenis atrasts pacientiem ar aktīvu trīskāršu koinfekciju salīdzinot ar latentu infekciju/koinfekciju un aktīvu dubultu koinfekciju, tādējādi parādot aktīvas vairāku vīrusu koinfekcijas lomu TNF- α līmeņa paaugstināšanā, kas liecina par iekaisumu, kas, savukārt, varētu būt radies vīrusu infekcijas dēļ ($p = 0,0045$ un $p = 0,0158$, attiecīgi). *Brenu* un līdzautori ziņo par augstāku TNF- α līmeni pacientiem ar ME/CFS, taču daļa autoru neatrod atšķirības starp pacientiem un kontrolēm (*Fletcher et al.*, 2009; *Nakamura et al.*, 2010; *Brenu et al.*, 2011; *Lidbury et al.*, 2017). Ir parādīts, ka ME/CFS gadījumos novēro zema līmeņa iekaisumu un šūnu imunitātes aktivāciju, un augsts TNF- α līmenis korelē ar vairākiem klīniskajiem simptomiem, tādējādi iekaisuma mediatoru pieaugums varētu izskaidrot slimības simptomu izpausmi (*Maes et al.*, 2012).

Līdzīgi, aktīvas trīskāršas koinfekcijas gadījumā IL-12 līmenis ir vairāk paaugstināts, nekā latentas infekcijas/koinfekcijas, aktīvas atsevišķas un aktīvas dubultas infekcijas gadījumos ($p = 0,0003$, $p = 0,0125$, $p = 0,0195$, attiecīgi). Tāda pati IL-12 tendence ir novērota starp pacientiem ar aktīvu trīskāršu koinfekciju un bez infekcijas ($p = 0,0636$). Paaugstināts IL-12 līmenis ir atzīts par potenciāli labu ME/CFS biomarkķieri (*Fletcher et al.*, 2009). *Russell* un līdzstrādnieki savā pētījumā arī fiksē pieaugošu IL-12 ekspresiju (*Russell et al.*, 2016). Pretēji, cita pētnieku grupa ziņo par pazeminātu IL-12 līmeni (*Visser et al.*, 2001).

Būtiski augstāku IL-10 līmeni novēro pacientiem ar aktīvu dubultu koinfekciju salīdzinot ar pacientiem bez infekcijas un ar latentu

infekciju/koinfekciju ($p = 0,029$ un $p = 0,0035$, attiecīgi). Tāpat, ME/CFS pacientiem ar aktīvu trīskāršu koinfekciju ir augstāks IL-10 līmenis, salīdzinot ar pacientiem bez infekcijas, ar latentu infekciju/koinfekciju un ar aktīvu atsevišķu infekciju ($p = 0,0107$, $p = 0,0034$ un $p = 0,0321$, attiecīgi). Tāda pati IL-10 pieauguma tendence pacientiem ar ME/CFS prezentēta vairākos citu autoru pētījumos (*Visser et al.*, 2001; *Ter Wolbeek et al.*, 2007; *Nakamura et al.*, 2010; *Brenu et al.*, 2011), taču, daži pētnieki atrod līdzīgu IL-10 līmeni gan pacientiem, gan kontrolēm, savukārt daži pat atrod augstāku IL-10 līmeni veselām kontrolēm (*Kavelaars et al.*, 2000; *Patarca*, 2001; *Fletcher et al.*, 2009; *Lidbury et al.*, 2017).

Citokīni var kalpot par vīrusa infekcijas ierosinātu šūnu imunitātes marķieri un paaugstināts noteiktu citokīnu līmenis var būt saistīts ar vīrusa infekcijas izraisītu iekaisumu (*Nastke et al.*, 2012). Šī pētījuma dati ataino būtiskas citokīnu līmeņa izmaiņas koinfekcijas gadījumā. Pie tam, pacienti ar aktīvu koinfekciju demonstrē augstāku iekaisuma un pretiekaisuma citokīnu līmeni. Ir pierādīts, ka iekaisuma citokīnu līmenis korelē ar ME/CFS smagumu un miega traucējumiem (*Milrad et al.*, 2017). Bez tam, TNF- α līmenis korelē ar noguruma pakāpi ME/CFS pacientiem (*Bansal et al.*, 2012). Mūsu pētījumā TNF- α , IL-12 un IL-10 līmenis ir statistiski būtiski augstāks pacientiem ar smagu ME/CFS slimības gaitu salīdzinot ar vidēji smagu gaitu ($p = 0,0434$, $p = 0,0494$ un $p = 0,025$). Pretēji, IL-6 līmenis tiecas būt augstāks pacientiem ar vidēji smagu slimību ($p = 0,0506$). Novērtēts, ka stress un nogurums ir lielāki pacientiem ar paaugstinātu IL-6 līmeni (*Lattie et al.*, 2012). Šajā pētījumā lielākā daļa pacietu (81.3%) ir ar vidēji smagu slimības gaitu, ko varētu izskaidrot ar IL-6 līmeni, kas nav būtiski paaugstināts.

Iespējams, ka vīrusa infekcija izraisa šūnu imunitātes disfunkciju, kas ierosina vīrusa reaktivēšanos. Sekojoši, vīrusa proteīni veicina citokīnu sekrēciju, kas rezultējas ar tādu ME/CFS tipisko simptomu parādīšanos, kā nogurums, drudzis, miega un kognitīvajiem traucējumiem (*Bansal et al.*, 2012).

Iekaisuma signāli var izraisīt hroniskas sāpes, ko izplata glijas šūnas, turklāt iekaisuma citokīni un neironu stimulācija var aktivēt glijas šūnas (*Yasui et al.*, 2014; *Glassford*, 2017).

Vienlaikus ar vairāk kā sešus mēnešu ilgu hronisku nogurumu, kas ir visiem pacientiem ar diagnosticētu ME/CFS, biežāk novērotie simptomi šo pacientu vidū ir atmiņas traucējumi, samazināta koncentrēšanās un miega traucējumi. Procentuāli biežāka tipisko ME/CFS klīnisko simptomu klātbūtne ir konstatēta pacientiem Nīderlandē un Apvienotajā Karalistē. Bez šiem simptomiem, kognitīvā disfunkcija, miega traucējumi un vārgums pēc piepūles ir biežāk ziņotie un ir atzīti par būtiskākajiem ME/CFS simptomiem (*Collin et al.*, 2016).

Atsevišķas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas analizēšana neatklāj statistiski būtiskas atšķirības tipisko ME/CFS klīnisko simptomu sastopamībā starp pacientiem ar persistentu infekciju latentā un aktīvā fāzē. Taču, pacientiem ar B19V genoma secības klātbūtni un antivielām pret NS1 proteīnu būtiski biežāk ir locītavu sāpes (55%), nekā pacientiem ar B19V genoma secību, bet bez NS1 antivielām (21,1%) ($p = 0,0294$). Muskuļu sāpes un limfadenopātiju biežāk novēro pacientiem ar (65% un 65%), nekā pacientiem bez (42,1% un 31,6%) NS1 antivielām ($p = 0,1517$ un $p = 0,0369$, attiecīgi). Tādas ar B19V asociētās ME/CFS klīniskās manifestācijas, kā nogurums, limfadenopātija, locītavu un muskuļu sāpes, varētu būt B19V infekcijas sekas. Ir publicēti ziņojumi par B19V kā ME/CFS tipisko klīnisko simptomu izraisītāju, tādēļ vairākos pētījumos ziņots, ka, vismaz daļai pacientu, B19V varētu būt viens no palaidējfactoriem, kas ir saskaņā ar mūsu pētījuma rezultātiem (*Matano et al.*, 2003; *Appel et al.*, 2007; *Fremont et al.*, 2009).

Analizējot ME/CFS tipisko klīnisko simptomu sastopamību HHV-6/HHV-7/B19V koinfekcijas gadījumā, nav atrastas būtiskas atšķirības starp pacientu grupām ar persistentu koinfekciju latentā un aktīvā fāzē. Tomēr, locītavu sāpes biežāk novēro pacientiem ar persistentu atsevišķu infekciju

latentā, nekā aktīvā fāzē ($p = 0,0452$) un vairāk pacientiem ar persistentu dubultu un trīskāršu koinfekciju aktīvā, nekā latentā fāzē, taču atšķirības nav statistiski nozīmīgas. Turklāt, jauna tipa galvassāpes ir klātesošas vairāk pacientiem ar persistentu trīskāršu koinfekciju latentā, nekā aktīvā fāzē ($p = 0,0052$). Subfebrilitāte sastopama vairāk pacientiem ar persistentu atsevišķu, dubultu un trīskāršu koinfekciju aktīvā, nekā latentā fāzē, tomēr pārsvars nav statistiski būtisks. Ņemot vērā, ka ME/CFS diagnosticē vismaz sešus mēnešus pēc pirmo slimības simptomu aizsākšanās un paraugus savāc vēl ilgāku laika periodu pēc ME/CFS sākuma, ir grūti skaidri identificēt persistentas infekcijas latentu vai aktīvu fāzi slimības sākumā. Šie rezultāti var norādīt uz iespējamo persistentas infekcijas lomu ME/CFS attīstībā vai vīrusa infekcijas sekām, kas slimības aizsākumā varēja būt aktīvā fāzē un parauga savākšanas laikā ir latentā fāzē, kaut gan klīniskie simptomi ir saglabājušies.

Statistiski būtisku atšķirību trūkums, salīdzinot klīniskos simptomus starp ME/CFS pacientu grupām ar persistentu infekciju latentā un aktīvā fāzē, varētu rasties diagnostikas kritēriju dēļ, jo visiem pacientiem jābūt vismaz sešus mēnešus ilgam hroniskam nogurumam un vismaz četriem no astoņiem tipiskajiem ME/CFS simptomiem, tādējādi simptomu biežuma variācija ir ierobežota. Vērā ņemams ir arī fakts, ka dažādaise pacientu skaits – no sešiem līdz 54 pacientiem, analizētajās grupās ar latentu un aktīvu atsevišķu, dubultu un trīskāršu infekciju, ietekmē statistisko analīzi.

ME/CFS klīnisko simptomu sastopamības biežums atšķiras arī starp dažādām valstīm un ir atkarīgs no pacienta raksturojuma, blakussaslimšanām un paša pacienta ziņotajiem rādītājiem. Joprojām nav skaidrs, vai simptomu kopa noved pie hroniskas slimības vai arī simptomi attīstās hroniskas slimības laikā (*Collin et al.*, 2016). Tādi gripai līdzīgi simptomi, kā nogurums, locītavu, muskuļu un ekstremitāšu sāpes, jutīgi limfmezgli un galvassāpes, ir sastopami ne tikai vairumam citu pētījumu pacientiem, bet arī daudziem pacientiem šajā pētījumā. *Friedberg* un viņa kolēģi ziņo, ka vīrusu infekcija un imūnie faktori

visbiežāk izraisa ME/CFS gan pacientiem ar īsu, gan garu slimības ilgumu, turklāt persistents stress ir minēts kā otrs biežākais ME/CFS etioloģiskais faktors (*Friedberg et al.*, 2000).

Lai novērtētu imūnsistēmas funkcijas un simptomu smaguma variācijas laika gaitā, ir nepieciešams veikt ilgstošus pētījumus, kas ir parādīts dažos ziņojumos (*Hardcastle et al.*, 2015; *Mensah et al.*, 2017). Turklāt, lai noteiktu iespējamo biomarkieru specifiskumu, ir jāsalīdzina rezultāti ne tikai starp pacientiem ar ME/CFS un kontrolēm, bet arī ar citām blakusslimšanām, kā, piemēram, izkaisītā skleroze vai depresija. Biomarkieris jāizvēlas, apsverot tā izmaksas un iespēju izmantot klīnikā, jo dārgas un ļoti sarežģītas metodes, visdrīzāk, netiks ieviestas ikdienas praksē (*Fischer et al.*, 2014). Tādēļ, šajā pētījumā izvēlētās metodes ir rentablas rutīnas analīzēm laboratorijās.

Kontrolēti klīniskie pētījumi nākotnē ļaus novērtēt pretvīrusu terapijas efektivitāti, kam rezultējoties klīniskajos uzlabojumos, tiks apstiprināta saistība ar slimību (*Clark*, 2016). Ņemot vērā ME/CFS heterogenitāti, biomarkieru izmantošana ļaus definēt slimības apakštipus. Turklāt, nepieciešams veikt ilgstošus un standartizētus pētījumus, lai noteiktu ME/CFS gaitas fenotipu un rādītājus, kā arī terapijas efektivitāti ar atkārtotiem mērījumiem dinamiskā. Tas ļaus prognozēt slimības attīstību, veicinās specifiskas diagnostikas definīcijas un ārstēšanas stratēģijas uzlabošanu (*Fischer et al.*, 2014).

4. SECINĀJUMI

1. Pierādījumi par XMRV infekcijas esamību pacientiem ar ME/CFS un praktiski veseliem indivīdiem nav atrasti, tāpēc hipotēze par XMRV saistību ar ME/CFS attīstību ir noliegta.

2. Persistenta HHV-6 un HHV-7 infekcija aktīvā fāzē būtiski biežāk un ar augstāku vīrusa slodzi sastopama pacientiem ar ME/CFS nekā praktiski veseliem indivīdiem un biežāk ME/CFS pacientiem Latvijā konstatētais HHV-6 tips ir HHV-6B.

3. Biežāka aktīvas B19V (genotipa 1) infekcijas atrade ar augstāku B19V slodzi pacientiem ar ME/CFS nekā praktiski veseliem indivīdiem un infekcijas laika sakritība ar slimības simptomu aizsākšanos norāda uz B19V kā iespējamo ME/CFS attīstības palaidējfaktoru.

4. Persistenta HHV-6, HHV-7 un B19V koinfekcija aktīvā fāzē ir būtiski izplatītāka ME/CFS pacientu vidū, salīdzinot ar veseliem donoriem, un to raksturo augstāka vīrusa slodze un citokīnu līmeņa izmaiņas nekā latentas infekcijas fāzē. Tādēļ, HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas marķierus varētu izmantot kā vienu no biomarķieriem ME/CFS diagnostikā.

5. Pacientiem ar ME/CFS ir paaugstināts citokīnu līmenis, kas liecina par imūnsistēmas atbildi uz iekaisumu, ko spēj izraisīt dažādi infekciozi aģenti. Arī persistenta HHV-6, HHV-7 un B19V koinfekcija aktīvā fāzē var būtiski ietekmēt iekaisuma un pretiekaisuma citokīnu līmeņa paaugstināšanos, kas savukārt varētu novest pie imūnsistēmas traucējumiem un ME/CFS simptomu attīstības.

6. Pastāv lielāka iespēja, ka ME/CFS pacientiem ar attiecīgu vīrusa infekciju izpaudīsies tieši tie diagnostikas kritērijos definētie slimības klīniskie simptomi, kas ir tipiski attiecīgajai vīrusa infekcijai.

7. Augstāka HHV-6 un HHV-7 slodze un būtiski paaugstināts iekaisuma citokīnu TNF- α , IL-12 un pretiekaisuma citokīna IL-10 līmenis pacientiem ar smagāku ME/CFS klīnisko gaitu liecina par vīrusu infekcijas iesaisti ME/CFS attīstībā.

5. REKOMENDĀCIJAS

1. Pilnveidot Latvijas ģimenes ārstu zināšanas par ME/CFS, lai nodrošinātu šīs slimības atpazīšanu un atbilstošu diagnostiku.

2. Informēt sabiedrību par ME/CFS esamību, būtību un tā izpausmēm, lai veicinātu toleranci un izpratni par šo slimību.

3. Klīniskajā diagnostikā izmantot vairāk kā vienus ME/CFS diagnostikas kritērijus, lai palielinātu diagnozes jutību un specifiskumu.

4. Analizēt aktīvas HHV-6, HHV-7 un B19V infekcijas marķieru klātbūtni pacientiem ar ME/CFS, lai novērtētu iespējamās etioloģijas faktorus un veidotu ārstēšanas stratēģijas saskaņā ar slimības smagumu un infekcijas aktivitātes fāzi, izvērtējot vīrusspecifiskās terapijas pielietošanas mērķtiecību.

6. PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

6.1. Raksti žurnālos, kas iekļauti starptautiskās datu bāzēs

1. Chapenko, S., Krumina, A., Logina, I., **Rasa, S.**, Chistjakovs, M., Sultanova, A., Viksna, L. and Murovska, M. Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus B19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Advances in Virology*. 2012, 2012, 1–7.
2. **Rasa, S.**, Nora-Krukle, Z., Chapenko, S., Krumina, A., Roga, S., Murovska, M. No evidence of XMRV provirus sequences in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and individuals with unspecified encephalopathy. *New Microbiologica*. 2014, 37, 17–24.
3. Prusty, B. K., Gulve, N., **Rasa, S.**, Murovska, M., Hernandez, P. C., Ablashi, D. V. Possible Chromosomal and Germline Integration of Human Herpesvirus 7 (HHV-7). *The Journal of General Virology*. 2017, 98 (2), 266–274.

6.2. Raksti citos žurnālos un rakstu krājumos

1. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Krumina, A., Chistyakovs, M., Viksna, L., Logina, I., Gintere, S., Murovska, M. Role of beta-herpesviruses infection in the development of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Immunomodulating Human Herpesviruses and their Role in Human Pathologies*. 2011, 16–20.
2. Čistjakovs, M., Čapenko, S., Sultanova, A., **Rasa, S.**, Krūmiņa, A., Murovska, M. Beta-herpesvīrusu HHV-6 un HHV-7 infekcija un citokīnu līmeņa izmaiņas plazmā pacientiem ar hroniskā noguruma sindromu. *RSU Zinātniskie Raksti: 2010.gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Medicīnas bāzes zinātnes*. 2011, 2, 121–125.
3. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Krūmiņa, A., Kozireva, S., Murovska, M. Parvovīrusa B19 infekcijas saistība ar hroniskā noguruma sindromu. *RSU Zinātniskie raksti: 2011.gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija*. 2012, 1, 217–224.
4. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Krūmiņa, A., Nora-Krukle, Z., Murovska, M. Ksenotropā peļu leukozes vīrusam radniecīgā vīrusa, cilvēka herpesvīrusu-6, herpesvīrusa-7 un parvovīrusa B19 saistība ar hroniskā noguruma sindromu/mialģisko encefalomiēlītu. *RSU Zinātniskie raksti 2012: 2012.gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija*. 2013, 2, 242–249.

5. Krumina, A., Vasiljeva, G., Ivanovs, A., Gintere, S., Kovalchuka, L., **Rasa, S.**, Chapenko, S., Murovska, M., Viksna, L., Logina, I. Assessment of Value of Fatigue Severity and Symptoms in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis and Fibromyalgia. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 2014, 4 (36), 5866–5877.
6. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Krūmiņa, A., Nora-Krūkle, Z., Roce, A., Murovska, M. Interleikīna-10 līmenis asins plazmā beta-herpesvīrusu koinfekcijas gadījumā pacientiem ar mialģisko encefalomiēlītu/hroniskā noguruma sindromu. *RSU Zinātniskie raksti 2013: 2013.gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija*. 2014, 204–211.
7. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Vanaga, A., Mihailova, M., Logina, I., Krumina, A., Murovska, M. Human parvovirus B19 infection status in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *Collection of Scientific Papers: Research articles in medicine & pharmacy, 2014: Internal Medicine. Surgery. Medical Basic Sciences. Stomatology. Pharmacy*. 2014, 55–63.

6.3. Prezentācijas starptautiskās konferencēs/kongresos

1. Logina, I., Krumina, A., Chapenko, S., **Rasa, S.**, Chistyakov, M., Sultanova, A., Murovska, M. Pain in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis patients: relation to active HHV-6, HHV-7 and parvovirus B19 infection/co-infection. *European Journal of Pain Supplements* 5, DOI:10.1016/S1754-3207(11)70434-5. Abstract of Pain in Europe VII. The Congress of the European Federation of IASP. Hamburg, Germany, September 21–24, 2011, pp.127.
2. Murovska, M., Chapenko, S., Krumina, A., Logina, I., **Rasa, S.**, Chistyakov, M., Sultanova, A., Viksna, L. Presence of Active HHV-6, HHV-7 and Parvovirus B19 infection/Co-infection in patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *CFS/ME Biennial International Conference Translating Evidence into Practice Syllabus*. Canada, Ontario, Ottawa, September 22–25, 2011.
3. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Nora-Krūkle, Z., Krumina, A., Murovska, M. Detection of XMRV, HHV-6 and HHV-7 genomic sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *22nd Annual Meeting of the Society for Virology programme*. Essen, Germany, March 14–17, 2012, pp. 543.
4. **Rasa, S.**, Nora-Krūkle, Z., Chapenko, S., Krumina, A., Murovska, M. Detection of xenotropic murine leukemia virus-related gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis in Latvia. *International Medical Meeting Abstract Book*. Riga, Latvia, September 7–9, 2012, pp. 48.
5. **Rasa, S.**, Krumina, A., Nora-Krūkle, Z., Chapenko, S., Murovska, M. Association of human herpesvirus-6 and 7 and parvovirus B19 with

- chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *School of Translational Immunology Abstract Book*. Belgrade, Serbia, September 19–21, 2012, pp. 149.
6. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Nora-Krukke, Z., Krumina, A., Viksna, L., Murovska, M. Co-infection of HHV-6 and HHV-7 in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *8th International Conference on HHV-6&7 Program Book*. Paris, France, April 8–10, 2013, pp.76.
 7. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Krumina, A., Viksna, L., Murovska, M. Occurrence of typical clinical symptoms and markers of human parvovirus B19 infection in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *IACFS/ME 11th Biennial International Conference Translating Science into Clinical Care Syllabus*. San Francisco, California, USA, March 20–23, 2014, pp. 24.
 8. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Vanaga, A., Mihailova, M., Krumina, A., Logina, I., Murovska, M. Serologically approved parvovirus B19 infection status in viremic cases of patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. *15th Biennial International Parvovirus Workshop Abstract Book*. Bordeaux, France, June 22–26, 2014, P-15.
 9. Murovska, M., **Rasa, S.**, Cistjakovs, M., Roga, S., Krumina, A., Logina, I., Chapenko, S. Possible involvement of human herpesvirus-6 infection in the development of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome, fibromyalgia and encephalopathy. *International Union of Microbiological Societies Congresses Abstracts Resumes*. Montreal, Canada, July 27–August 1, 2014, pp. 613.
 10. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Zazerska, Z., Krumina, A., Murovska, M. Evidence of human parvovirus B19 infection in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Program & Poster Abstracts Thirty-First Annual Clinical Virology Symposium and Annual Meeting of the Pan American Society for Clinical Virology*, 31st Clinical Virology Symposium. Daytona Beach, USA, April 26–29, 2015, pp. 90–91.
 11. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Zazerska, Z., Vilmane, A., Krumina, A., Murovska, M. Level of TNF-alpha in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients with beta-herpesviruses infection. *1st Baltic Conference Immunological modelling: theory and practice programme and abstracts*. Riga, Latvia, May 13–15, 2015, pp 88–89.
 12. Murovska, M., Nora-Krukke, Z., Gravelina, S., **Rasa, S.**, Zazerska, Z., Chapenko, S., Lin, Y. C., Lin, J. H., Liu, H. F. Parvovirus B19 detection frequency and genotype analysis in various Latvian patients' cohorts. *XVIIth International Parvovirus Workshop abstracts*. Ajaccio, Corsica, France, June19–23, 2016, pp. 77.
 13. **Rasa, S.**, Chapenko, S., Krumina, A., Zazerska, Z., Murovska, M. Occurrence, phase and status of human parvovirus B19 infection in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome.

6.4. Prezentācijas vietēja mēroga konferencēs/kongresos

1. Svilpe, S., Krūmiņa, A., Čistjakovs, M., **Rasa, S.**, Čapenko, S., Murovska, M., Logina, I. Neuroloģisko simptomu un sindromu izvērtējums pacientiem ar hroniskā noguruma sindromu. *Rīgas Stradiņa universitātes 2010. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2010. gada 18. – 19. marts, 161. lpp.
2. Chistyakovs, M., **Rasa, S.**, Chapenko, S., Krumina, A., Sultanova, A., Murovska, M. Plasma Levels of Various Cytokines and Activation of Immunomodulating Beta-herpesviruses in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Rīgas Stradiņa universitātes 2010. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2010. gada 18. – 19. marts, 196. lpp.
3. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Krūmiņa, A., Kozireva, S., Murovska, M. Parvovīrusa B19 saistība ar hroniskā noguruma sindromu. *Rīgas Stradiņa universitātes 2011. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2011. gada 14. – 15. aprīlis, 220. lpp.
4. Krūmiņa, A., Logina, I., Svilpe, S., Gintere, S., Čapenko, S., **Rasa, S.**, Čistjakovs, M., Sultanova, A., Vīksna, L., Murovska, M. Aktīvu HHV-6, HHV-7 un parvovīrusa B19 koinfekciju atrade pacientiem ar hroniskā noguruma sindromu/mialģisko encefalomiēlītu. Apvienotā Pasaules latviešu zinātnieku 3. Kongresa un Letonikas 4. Kongresa Medicīnas sekcijas “Medicīnas zinātne un Latvijas sabiedrības veselība XXI gadsimtā” tēzes. Rīga, Latvija, 2011. gada 24. – 27. oktobris, 54. – 55. lpp.
5. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Krūmiņa, A., Nora-Krūkle, Z., Roce, A., Murovska, M. Interleikīna-10 ekspresijas līmenis beta-herpesvīrusu koinfekcijas gadījumā pacientiem ar mialģisko encefalomiēlītu/hroniskā noguruma sindromu. *Rīgas Stradiņa universitātes 2013. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2013. gada 21. – 22. marts, 189. lpp.
6. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Nora-Krūkle, Z., Mihailova, M., Logina, I., Krūmiņa, A., Murovska, M. Cilvēka parvovīrusa B19 infekcijas stāvoklis slimniekiem ar mialģisko encefalomiēlītu/hroniskā noguruma sindromu un fibromialģiju. *Rīgas Stradiņa universitātes 2014. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2014. gada 10. – 11. aprīlis, 207. lpp.
7. **Rasa, S.**, Čapenko, S., Zazerska, Z., Krūmiņa, A., Murovska, M. Cilvēka parvovīrusa B19 infekcijas sastopamība un slodze pacientiem ar mialģisko encefalomiēlītu/hroniskā noguruma sindromu un praktiski veselīgiem indivīdiem. *Rīgas Stradiņa universitātes 2015. gada zinātniskās konferences tēzes*. Rīga, Latvija, 2015. gada 26. – 27. marts, 206. lpp.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Ablashi, D. V., Eastman, H. B., Owen, C. B. et al. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *Journal of Clinical Virology*. 2000, 16 (3), 179–191.
2. Albright, F., Light, K., Light, A. et al. Evidence for a heritable predisposition to Chronic Fatigue Syndrome. *BMC Neurology*. 2011, 11: 62.
3. Aoki, R., Kobayashi, N., Suzuki, G. et al. Human herpesvirus 6 and 7 are biomarkers for fatigue, which distinguish between physiological fatigue and pathological fatigue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016, 478 (1), 424–430.
4. Appel, S., Chapman, J., Shoenfeld, Y. Infection and vaccination in chronic fatigue syndrome: myth or reality? *Autoimmunity*. 2007, 40 (1), 48–53.
5. Bakken, I. J., Tveito, K., Gunnes, N. et al. Two age peaks in the incidence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a population-based registry study from Norway 2008–2012. *BMC Medicine*. 2014, 12, 167.
6. Bansal, A. S., Bradley, A. S., Bishop, K. N. et al. Chronic fatigue syndrome, the immune system and viral infection. *Brain, Behavior and Immunity*. 2012, 26 (1), 24–31.
7. Barah, F., Vallely, P. J., Chiswick, M. L. et al. Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis. *Lancet*. 2001, 358, 729–730.
8. Barah, F., Whiteside, S., Batista, S., Morris, J. Neurological aspects of human parvovirus B19 infection: a systematic review. *Reviews in Medical Virology*. 2014, 24 (3), 154–168.
9. Berneman, Z.N., Gallo, R. C., Ablashi, D. V. et al. Human herpesvirus 7 (HHV-7) strain JI: independent confirmation of HHV-7. *Journal of Infectious Diseases*. 1992, 166, 690–691.
10. Brenu, E. W., van Driel, M. L., Staines, D. R. et al. Immunological abnormalities as potential biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9, 81.
11. Broderick, G., Fuite, J., Kreitz, A. et al. A formal analysis of cytokine networks in Chronic Fatigue Syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2010. 24 (7), 1209–1217.
12. Buchwald, D., Cheney, P. R., Peterson, D. L. et al. A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection. *Annals of Internal Medicine*. 1992, 116 (2), 103–113.
13. Burbelo, P. D., Bayat, A., Wagner, J. et al. No serological evidence for a role of HHV-6 infection in chronic fatigue syndrome. *American Journal of Translational Research*. 2012, 4 (4), 443–451.
14. Cameron, B., Flamand, L., Juwana, H. et al. Serological and virological investigation of the role of the herpesviruses EBV, CMV and HHV-6 in post-infective fatigue syndrome. *Journal of Medical Virology*. 2010, 82 (10), 1684–1688.

15. Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P., Menotti, L. Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*. 1999, 5, 353–366.
16. Carruthers, B. M., van de Sande, M. I., De Meirleir, K. L. et al. Myalgic Encephalomyelitis: International Consensus Criteria. *Journal of Internal Medicine*. 2011, 270 (4), 327–338.
17. Caselli, E., Di Luca, D. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *The New Microbiologica*. 2007, 30 (3), 173–187.
18. Chapenko, S., Krumina, A., Kozireva, S. et al. Activation of human herpesviruses 6 and 7 in patients with chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Virology*. 2006, 37 (1), 47–51.
19. Chapenko, S., Krumina, A., Logina, I. et al. Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus B19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Advances in Virology*. 2012, 2012, 1–7.
20. Clark, D. A. Clinical and laboratory features of human herpesvirus 6 chromosomal integration. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016, 22 (4), 333–339.
21. Collin, S. M., Nikolaus, S., Heron, J. et al. Chronic fatigue syndrome (CFS) symptom-based phenotypes in two clinical cohorts of adult patients in the UK and The Netherlands. *Journal of Psychosomatic Research*. 2016, 81, 14–23.
22. Cooling, L. L., Koerner, T. A., Naides, S. J. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995, 172 (5), 1198–1205.
23. Couper, K. N., Blount, D. G., Riley, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 2008, 180 (9), 5771–5777.
24. De Bolle, L., Naesens, L., De Clercq, E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18 (1), 217–245.
25. Di Luca, D., Zorzenon, M., Mirandola, P. et al. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, 33 (6), 1660–1661.
26. Dong, B., Kim, S., Hong, S. et al. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104, 1655–1660.
27. Endo, A., Watanabe, K., Ohye, T. et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, 59, 545–548.
28. Fischer, D. B., William, A. H., Strauss, A. C. et al. Chronic Fatigue Syndrome: The Current Status and Future Potentials of Emerging Biomarkers. *Fatigue*. 2014, 2 (2), 93–109.
29. Fletcher, M. A., Zeng, X. R., Barnes, Z. et al. Plasma cytokines in women with chronic fatigue syndrome. *Journal of Transplantational Medicine*. 2009, 7, 96.

30. Fremont, M., Metzger, K., Hulstaert, J., De Meirleir, K. Detection of herpesviruses and parvovirus B19 in gastric and intestinal mucosa of chronic fatigue syndrome patients. *In Vivo*. 2009, 23, (2), 209–213.
31. Friedberg, F. Chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and related illnesses: a clinical model of assessment and intervention. *Journal of Clinical Psychology*. 2010, 66 (6), 641–665.
32. Fukuda, K., Straus, S. E., Hickie, I. et al. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *Annals of Internal Medicine*. 1994, 121, 953–959.
33. Glassford, J. A. The Neuroinflammatory Etiopathology of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *Frontiers in Physiology*. 2017, 8, 88.
34. Gravel, A., Dubuc, I., Morissette, G. et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015, 112 (26), 8058–8063.
35. Groom, H. C., Bishop, K. N. The tale of xenotropic murine leukemia virus-related virus. *The Journal of General Virology*. 2012, 93 (5), 915–924.
36. Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., et al., New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 2010, 59, 307–321.
37. Halpin, P., Williams, M. V., Klimas, N. G. et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and gulf war illness patients exhibit increased humoral responses to the herpesviruses-encoded dUTPase: Implications in disease pathophysiology. *Journal of Medical Virology*. 2017, 89 (9), 1636–1645.
38. Hardcastle, S. L., Brenu, E. W., Johnston, S. et al. Longitudinal analysis of immune abnormalities in varying severities of Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis patients. *Journal of Translational Medicine*. 2015, 13, 299.
39. Hornig, M., Montoya, J. G., Klimas, N. G. et al. Distinct plasma immune signatures in ME/CFS are present early in the course of illness. *Science Advances*. 2015, 1(1), e1400121.
40. Hüfner, K., Arbusow, V., Himmelein, S. et al. The prevalence of human herpesvirus 6 in human sensory ganglia and its co-occurrence with alpha-herpesviruses. *Journal of Neurovirology*. 2007, 13 (5), 462–467.
41. Ito, K., Shimizu, N., Watanabe, K. et al. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2013, 52 (2), 201–211.
42. Johnston, S., Brenu, E. W., Staines, D., Marshall-Gradisnik, S. The prevalence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a meta-analysis. *Clinical Epidemiology*. 2013, 5, 105–110.
43. Kaufer, B. B., Flamand, L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Current opinion in virology*. 2014, 9, 111–118.
44. Kavelaars, A., Kuis, W., Knook, L. et al. Disturbed neuroendocrine-immune interactions in chronic fatigue syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000, 85, (2), 692–696.

45. Kerr, J. R., Gough, J., Richards, S. C. et al. Antibody to parvovirus B19 nonstructural protein is associated with chronic arthralgia in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *The Journal of General Virology*. 2010, 91 (4), 893–897.
46. Koelle, D. M., Barcy, S., Huang, M. L. et al. Markers of viral infection in monozygotic twins discordant for chronic fatigue syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2002, 35 (5), 518–525.
47. Kozireva, S. V., Zestkova, J. V., Mikazane, H. J. et al. Incidence and clinical significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2008, 35, (7), 1265–1270.
48. Kozireva, S., Nemceva, G., Danilane, I. et al. Prevalence of Blood-Borne Viral Infections (Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, Human Herpesvirus-7, Human Herpesvirus-8, Human T-Cell Lymphotropic Virus- I/II, Human Retrovirus-5) Among Blood Donors in Latvia. *Annals of Hematology*. 2001, 80, 669–673.
49. Krueger, G. R., Ablashi, D. Human Herpesvirus-6, Second Edition, *General Virology, Epidemiology and Clinical Pathology. Perspectives in Medical Virology*. Netherlands: Elsevier, 2006, 251–262.
50. Lattie, E. G., Antoni, M. H., Fletcher, M. A. et al. Stress management skills, neuroimmune processes and fatigue levels in persons with chronic fatigue syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012, 26 (6), 849–858.
51. Levine, S., Eastman, H., Ablashi, D. V. Prevalence of IgM and IgG Antibody to HHV-6 and HHV-8 and Results of Plasma PCR to HHV-6 and HHV-7 in a Group of CFS Patients and Healthy Donors. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*. 2001, 9 (1–2), 31–40.
52. Lidbury, B. A., Kita, B., Lewis, D. P. et al. Activin B is a novel biomarker for chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) diagnosis: a cross sectional study. *Journal of Translational Medicine*. 2017, 15 (1), 60.
53. Liefeldt, L., Plentz, A., Klempa, B. et al. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *Journal of Medical Virology*. 2005, 75 (1), 161–169.
54. Lo, S. C., Pripuzova, N., Li B. et al. Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107 (36), 15874–15879.
55. Loebel, M., Eckey, M., Sotzny, F. et al. Serological profiling of the EBV immune response in Chronic Fatigue Syndrome using a peptide microarray. *PloS One*. 2017, 12 (6), 1–17.
56. Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Das Gupta, J. et al. Detection of Infectious Retrovirus, XMRV, in Blood Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Science*. 2009, 326 (5952), 585–589.
57. Lyall, E. G., Cubie, H. A. Human herpesvirus-6 DNA in the saliva of paediatric oncology patients and controls. *Journal of Medical Virology*. 1995, 47 (4), 317–322.

58. Maes, M., Twisk, F. N., Kubera, M., Ringel, K. Evidence for inflammation and activation of cell-mediated immunity in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): increased interleukin-1, tumor necrosis factor- α , PMN-elastase, lysozyme and neopterin. *Journal of Affective Disorders*. 2012, 136 (3), 933–939.
59. Matano, S., Kinoshita, H., Tangawa, K. et al. Acute parvovirus B19 infection mimicking chronic fatigue syndrome. *Internal Medicine*. 2003, 42 (9), 903–905.
60. Mensah, F. K. F., Bansal, A. S., Ford, B., Cambridge, G. Chronic fatigue syndrome and the immune system: Where are we now? *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*. 2017, 47 (2), 131–138.
61. Milrad, S. F., Hall, D. L., Jutagir, D. R. et al. Poor sleep quality is associated with greater circulating pro-inflammatory cytokines and severity and frequency of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) symptoms in women. *Journal of Neuroimmunology*. 2017, 303, 43–50.
62. Mirandola, P., Menegazzi, P., Merighi, S. et al. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *Journal of Virology*. 1998, 72 (5), 3837–3844.
63. Morinet, F., Corruble, E. Chronic Fatigue Syndrome and Viral Infections. An International Perspective on the Future of Research in Chronic Fatigue Syndrome. Ed. by Snell C. R. ISBN: 978-953-51-0072-0 – Croatia: InTech, 2012. – Pp. 1–12. Available from: <http://www.intechopen.com/books/an-international-perspective-on-the-future-of-research-in-chronic-fatigue-syndrome/chronic-fatigue-syndrome-and-viral-infections>.
64. Munakata, Y., Kato, I., Saito, T. et al. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. *Virology*. 2006, 345, 251–257.
65. Nakamura, T., Schwander, S.K., Donnelly, R. et al. Cytokines across the night in chronic fatigue syndrome with and without fibromyalgia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010, 17 (4), 582–587.
66. Nastke, M. D., Becerra, A., Yin, L. et al. Human CD4⁺ T cell response to human herpesvirus 6. *Journal of Virology*. 2012, 86 (9), 4776–4792.
67. Nicolson, G. L., Gan, R., Haier, J. Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: association with signs and symptoms. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 2003, 111 (5), 557–566.
68. Oakes, B., Hoagland-Henefield, M., Komaroff, A. L. et al. Human endogenous retrovirus-K18 superantigen expression and human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 viral loads in chronic fatigue patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 56 (10), 1394–1400.
69. Patarca, R. Cytokines and chronic fatigue syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001, 933, 185–200.
70. Pfepper, K. I., Enders, M., Motz, M. Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health*. 2005, 52 (7–8), 362–365.

71. Politou, M., Koutras, D., Kaparos, G. et al. Seroprevalence of HHV-6 and HHV-8 among blood donors in Greece. *Virology Journal*. 2014, 11, 153.
72. Prusty, B. K., Gulve, N., Rasa, S. et al. Possible Chromosomal and Germline Integration of Human Herpesvirus 7 (HHV-7). *The Journal of General Virology*. 2017, 98 (2), 266–274.
73. Prusty, B. K., Krohne, G., Rudel, T. Reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus-6 by telomeric circle formation. *PLoS Genetics*. 2013, 9 (12), e1004033 b.
74. Prusty, B. K., Siegl, C., Hauck, P. et al. Chlamydia trachomatis infection induces replication of latent HHV-6. *PLoS One*. 2013, 8 (4), e61400.
75. Reeves, W. C., Stamey, F. R., Black, J. B. et al. Human herpesviruses 6 and 7 in chronic fatigue syndrome: a case-control study. *Clinical Infectious Diseases*. 2000, 31 (1), 48–52.
76. Russell, L., Broderick, G., Taylor, R. et al. Illness progression in chronic fatigue syndrome: a shifting immune baseline. *BMC Immunology*. 2016, 17, 3.
77. Sairenji, T., Nagata, K. Viral infections in chronic fatigue syndrome. *Nihon Rinsho*. 2007, 65 (6), 991–996.
78. Sairenji, T., Yamanishi, K., Tachibana, Y. et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in patients with chronic fatigue syndrome. *Intervirology*. 1995, 38 (5), 269–273.
79. Sanders, P., Korf, J. Neuroaetiology of chronic fatigue syndrome: an overview. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2008, 9 (3), 165–171.
80. Secchiero, P., Carrigan, D. R., Asano, Y. et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995, 171 (2), 273–280.
81. Servant-Delmas, A., Lefrere, J. J., Morinet, F., Pillet, S. Advances in human B19 erythrovirus biology. *Journal of Virology*. 2010, 84, 9658–9665.
82. Streiter, M., Malecki, M., Prokop, A. et al. Does human bocavirus infection depend on helper viruses? A challenging case report. *Virology Journal*. 2011, 8, 417.
83. Sultanova, A., Cistjakovs, M., Gravelsina, S. et al. Association of active human herpesvirus-6 (HHV-6) infection with autoimmune thyroid gland diseases. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017, 23 (1), 50.e1–50.e5.
84. Takahashi, Y., Murai, C., Shibata, S. et al. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, 95, 8227–8232.
85. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013, 30, 2725–2729.
86. Ter Wolbeek, M., van Doornen, L. J., Kavelaars, A. et al. Longitudinal analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine production in severely fatigued adolescents. *Brain, Behavior and Immunity*. 2007, 21 (8), 1063–1074.

87. Tomsone, V., Logina, I., Millers, A. et al. Association of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 with demyelinating diseases of the nervous system. *Journal of Neurovirology*. 2001, 7 (6), 564–569.
88. Traylen, C. M., Patel, H. R., Fondaw, W. et al. Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virology*. 2011, 6 (4), 451–463.
89. Underhill, R. A. Myalgic encephalomyelitis, chronic fatigue syndrome: An infectious disease. *Medical Hypotheses*. 2015, 85 (6), 765–773.
90. Urisman, A., Molinaro, R. J., Fischer, N. et al. Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNASEL Variant. *PLOS Pathogens*. 2006, 2 (3), e25.
91. Van den Bosch, G., Locatelli, G., Geerts, L. et al. Development of reverse transcriptase PCR assays for detection of active human herpesvirus 6 infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39 (6), 2308–2310.
92. Vandamme, A. M., Fransen, K., Debaisieux, L. et al. Standardisation of primers and an algorithm for HIV-1 diagnostic PCR evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin. The Belgian AIDS Reference Laboratories. *Journal of Virology Methods*. 1995, 51 (2–3), 305–316.
93. Visser, J., Graffelman, W., Blauw, B. et al. LPS-induced IL-10 production in whole blood cultures from chronic fatigue syndrome patients is increased but supersensitive to inhibition by dexamethasone. *Journal of Neuroimmunology*. 2001, 119 (2), 343–349.
94. von Pöblotzki, A., Hemauer, A., Gigler, A. et al. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995, 172, 1356–1359.
95. Wallace, H. L. 2nd, Natelson, B., Gause, W., Hay J. Human herpesviruses in chronic fatigue syndrome. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999, 6 (2), 216–223.
96. White, A. T., Light, A. R., Huguen, R. W. et al. Severity of symptom flare after moderate exercise is linked to cytokine activity in chronic fatigue syndrome. *Psychophysiology*. 2010, 47 (4), 615–624.
97. Winger, A., Kvarstein, G., Wyller, V. B. et al. Health related quality of life in adolescents with chronic fatigue syndrome: a cross-sectional study. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2015, 13, 96.
98. Yasui, M., Yoshimura, T., Takeuchi, S. et al. A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia*. 2014, 62 (9), 1407–1417.
99. Zhang, L., Gough, J., Christmas, D. et al. Microbial infections in eight genomic subtypes of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Journal of Clinical Pathology*. 2010, 63 (2), 156–164.

PATEICĪBAS

Es vēlos izteikt pateicību vadītājai *Dr. med.* asociētai profesorei Modrai Murovskai par darba vadīšanu, atbalstu, motivēšanu un ieguldījumu, kā arī vadošajai pētniecei *Dr. habil. biol.* Svetlanai Čapenko par apmācīšanu, līdzdarbošanos un konsultācijām darbā. Vēlos pateikties profesorei Angelikai Krūmiņai, profesorei Ludmilai Vīksnai un profesorei Inārai Loginai par klīniskā materiāla nodrošināšanu un par ieguldījumu klīniskās sadaļas izveidošanā, kā arī maniem kolēģiem RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā par atbalstu doktorantūras studiju laikā.

Es vēlos izteikt pateicību Zinātņu prorektorei profesorei Ivetai Ozolantai un Zinātniskai sekretārei Ingrīdai Kreilei par atbalstu doktorantūras studijās.

Pētījuma daļas finansēja šādi projekti: Nr. 6.2.-25/2013/0039; RSU ZP 13/2013; (2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009); 316275 un COST Action 15111.