

Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
Instituto de Química Biológica - Sección Virología

Detección de Bocavirus en muestras de  
aspirados nasofaríngeos de niños con  
infecciones respiratorias durante  
2008 y 2009

Cecilia Gayo

Tesis de grado

Licenciatura en bioquímica

Tutora: Dra. Sandra Frabasile

# Índice:

Resumen. . . . .	2
Introducción. . . . .	3
Generalidades y epidemiología. . . . .	3
Estructura del virión. . . . .	5
Transcripción y replicación. . . . .	7
Infecciones por HBoV y respuesta inmune. . . . .	11
Objetivos. . . . .	13
Materiales y métodos. . . . .	14
Muestras. . . . .	14
Extracción del ARN total. . . . .	14
Extracción del ADN total. . . . .	14
Obtención del stock de control positivo. . . . .	15
Clonado del gen NP1 de HBoV en pJet 1.2®. . . . .	15
Extracción del plásmido. . . . .	16
Identificación. . . . .	17
PCR de HBoV de las muestras de los años 2008 y 2009. . . . .	17
RT-PCR de HBoV de las muestras del año 2009. . . . .	17
Electroforesis en geles de agarosa. . . . .	18
Purificación. . . . .	18
Secuenciación. . . . .	19
Análisis de secuencia. . . . .	19
Resultados. . . . .	20
Obtención del control positivo. . . . .	20
Amplificación de las muestras de los años 2008 y 2009. . . . .	20
Purificación. . . . .	22
Secuenciación. . . . .	23
Análisis de secuencia. . . . .	23
Discusión y Conclusiones. . . . .	25
Bibliografía. . . . .	29

## **Resumen:**

El Bocavirus Humano (HBoV, por su sigla en inglés) es un virus respiratorio que fue descubierto en el año 2005 en muestras clínicas de niños suecos con infecciones respiratorias. Desde entonces se lo ha encontrado en cada país donde se lo ha buscado. Asimismo no solo se lo encontró en muestras respiratorias, sino que también en muestras fecales y séricas, sin embargo aun no se a podido determinar si HBoV es el agente etiológico causante directo de las infecciones, o si es un virus oportunista. Esta controversia se debe principalmente al alto porcentaje de coinfecciones que presenta este virus, pudiendo llegar a un 90%.

El objetivo de este trabajo fue la detección y el análisis de HBoV en muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos provenientes de niños hospitalizados en el 2008 y 2009 en Uruguay. El virus fue detectado en 8 de las 57 muestras analizadas del 2008 (14%), pero no se encontró en ninguna de las 42 muestra del 2009. Los análisis de secuencia del gen NP1 mostraron un 100% de homología. Los porcentajes de detección obtenidos en el 2008 en relación a las muestras analizadas esta dentro de los rangos reportados y es similar al encontrado en otros países de la región. La ausencia de muestras positivas del año 2009 pudo estar relacionada con la pandemia de Influenza A H1N1 registrada en dicho año.

## **Introducción**

Las infecciones respiratorias son aquellas que ocurren en cualquier sector del aparato respiratorio, pudiéndose estas dividirse entre infecciones del tracto respiratorio superior e inferior. Las infecciones del tracto superior suelen ser menos severas y de etiología viral. Sin embargo las infecciones del tracto inferior son potencialmente graves, pudiendo causar la muerte, y ser originadas tanto por virus como por bacterias, hongos y protozoos. A pesar de la variabilidad de los agentes etiológicos capaces de infectar el tracto respiratorio inferior las manifestaciones clínicas son prácticamente idénticas en la mayoría de los casos (fiebre, tos, rinorrea y bronquiolitis). Por esta razón es necesario realizar un análisis molecular para poder identificar el agente causal de la enfermedad. Al conocer con exactitud la identidad del microorganismo, se puede realizar un diagnóstico veraz con el fin de efectuar un uso racional de los antibióticos a administrar [4, 6, 7].

### **Generalidades y epidemiología:**

Las infecciones respiratorias son la principal causa de morbimortalidad infantil, siendo responsable de aproximadamente un 29% de los fallecimientos de niños menores de 5 años a nivel mundial [8-10]. Se estima que el 90% de estas infecciones son causadas por agentes virales [11], siendo el Virus Respiratorio Sincicial (hVRS) el responsable de aproximadamente un 40% de las mismas, constituyendo así el principal agente infeccioso. Algunos de los restantes agentes virales son Rinovirus (HRV, por su sigla en inglés) (20%), Adenovirus (ADV) (8%), Metapneumovirus humano (hMPV, por su sigla en inglés) (8%) influenza A (INF A) e influenza B (INF B) (6%), Coronavirus (CoV) (5%), Parainfluenza 1-4 (PI) (4%), y Bocavirus humano (HBoV) (1,5 - 22,4%) [10, 12-17]. Las infecciones respiratorias virales presentan distintos patrones epidemiológicos, dependiendo del área geográfica: en los países con clima templado presentan un carácter estacional, registrándose una mayor prevalencia durante los meses

invernales, mientras que en los países de clima tropical la mayor prevalencia se observa en la estación de lluvias [12, 14, 15, 18].

El HBoV es uno de los virus más recientemente asociado a infecciones del tracto respiratorio humano, y fue descubierto por el grupo de investigación a cargo de Allander en el año 2005 [19]. En dicho trabajo se estudiaron secuencias nucleotídicas virales obtenidas de muestras de aspirados nasofaríngeos de niños y adultos suecos con infecciones en las vías respiratorias bajas. Como resultado del estudio se encontraron secuencias que alineaban con parvovirus bovino (BPV, por su sigla en inglés) y con “canine minute virus” (MVC), ambos miembros de la familia *Parvoviridae*, Subfamilia *Parvovirinae*, del género *Bocavirus*. Todas las muestras positivas provenían de niños, y su sintomatología (asma, hipoxia, bronquiolitis y fiebre entre otros síntomas respiratorios) era común a otros agentes virales. Al ser este virus el único agente encontrado en la mayoría de los casos, se lo consideró como posible agente etiológico de estos cuadros clínicos. Como es el único agente viral del género *Bocavirus* con la potencialidad de infectar al ser humano, se lo denominó de forma provisoria como *Bocavirus humano*, constituyendo, después del B19V, el segundo patógeno humano conocido de esta familia de virus.

Diferentes reportes sugieren que HBoV es endémico en todo el mundo, ya que se lo ha encontrado en cada lugar donde se lo ha estudiado, con una prevalencia que va desde 1,5% en Canadá hasta 22,4% en España, pasando por 4,4% en Francia, 5,6% en Taiwán, 5,7% en Japón, 8% en Irán, 8,3% en China, 10,3% en Alemania, 18,3% en Jordania y 19% en Suecia [15, 20-28]. Estas grandes variaciones pueden deberse a diferencias en la edad de la población analizada, en la estación en la cual fue tomada la muestra, en el tipo de técnica utilizada y que en algunos casos solo se analizaron muestras que dieron negativo para otros virus, eliminando aquellas que podrían estar coinfectadas. En todos los casos se observó que en la franja etaria donde hay una mayor proporción de pacientes HBoV positivos es en los niños menores de 2 años de edad.

Algo que llama poderosamente la atención es la alta proporción de coinfecciones observada en muestras positivas para HBoV. Se han reportado desde un 26,8% hasta un 95% de coinfección, pero esta variabilidad se debe a que en no todos los trabajos se estudiaron todos los virus que infectan el aparato respiratorio, encontrando un menor número de coinfecciones de las que en realidad existen [12, 14, 15, 22, 26-33]. Los virus con los que HBoV tiene un mayor número de coinfecciones son hVRS, con un rango que va desde el 2,9% [30] al 40,4% [26] y Adenovirus, con un rango de 4,9% [14] al 48,9% [26]. También se observa coinfecciones con Rinovirus, del 3% [31] al 20% [12], Metapneumovirus humano, del 1,8% [26] al 11% [14], Influenza A, del 1,8% [26] al 12,1% [31], Parainfluenza, del 1,1% [15] al 14,7% [30] y Coronavirus, del 3% [31] al 10% [12].

### **Estructura del virión:**

Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus que contienen una única cadena lineal de ADN de sentido negativo, aunque algunos miembros del género pueden tener ADN tanto de sentido positivo como negativo, en proporciones variables. Son virus desnudos, de pequeño tamaño (18-26 nm de diámetro), con cápside icosaédrica (Fig.1).

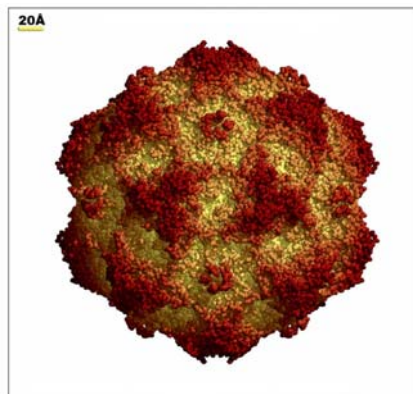


Fig. 1: Imagen de la estructura de un parvovirus, creada por un software informático, extraído de “Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses” [1].

En los extremos del genoma tienen repeticiones invertidas que forman estructuras secundarias en forma de horquilla (Fig. 2). El largo del genoma varía de 4 a 6 Kb. [2, 3, 34], hasta el momento se han determinado 5.299 nucleótidos del genoma de HBoV, aunque resta por definir la secuencia de las estructuras en horquillas de los extremos del mismo [19]. Su genoma tiene un marco de lectura abierto (en inglés open reading frame, ORF) que incluye otro más pequeño en fase, hacia el extremo 3', generando las proteínas capsídicas VP1 y VP2 respectivamente, a su vez tiene otros dos ORFs uno de ellos de gran tamaño, hacia el extremo 5', que codifica la proteína NS1, y otro pequeño, en el medio de los antes mencionados, que transcribe la proteína NP1 [2, 3, 19, 34]. (Fig. 2 y 3)

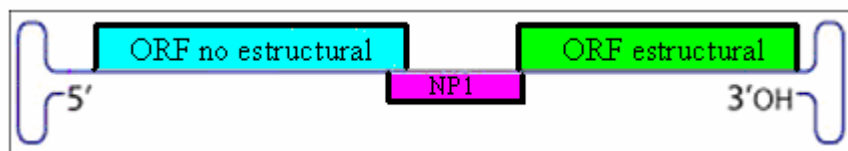


Fig. 2: Esquema del genoma de un parvovirus. Disponible desde: <http://expasy.org/viralzone/>

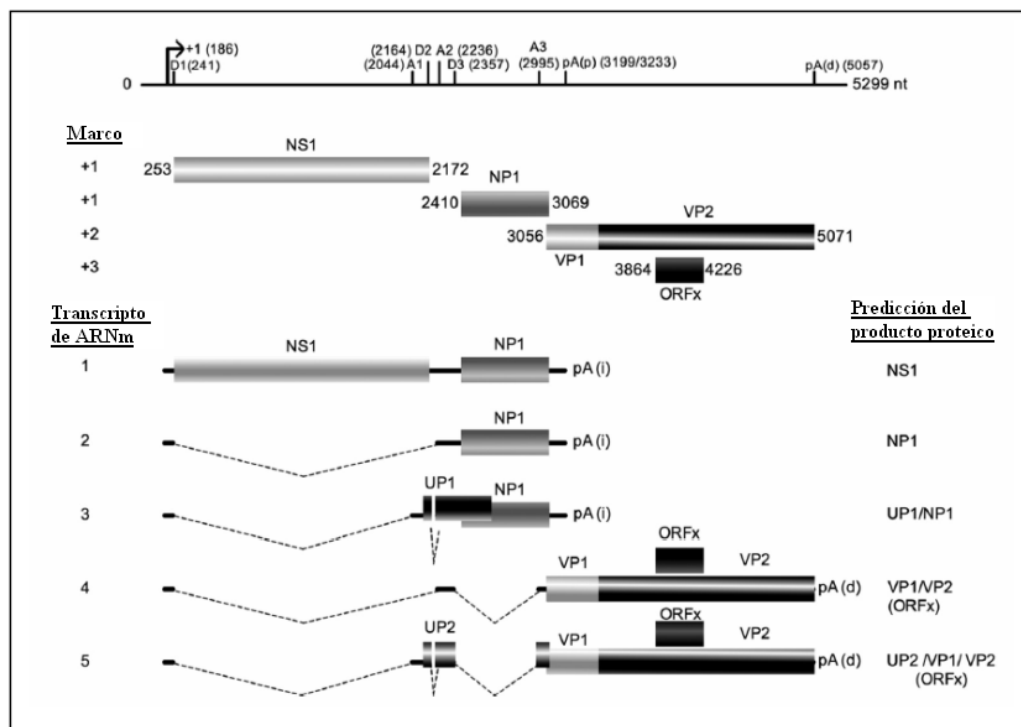


Fig. 3: Esquema de los marcos abiertos de lectura, de los transcritos de ARNm y los posibles productos proteicos. Extraído y modificado del trabajo de Dijkman et al.[5]

### **Transcripción y replicación:**

Realizando un paralelismo entre HBoV y los restantes virus integrantes de la familia *Parvoviridae* se puede deducir algunas de las funciones de las proteínas de HBoV.

Como se indicó anteriormente las proteínas VP1 y VP2 conforman la cápside protéica del virión. VP1 tiene un dominio fosfolipasa A2 dependiente de calcio, que facilita la entrada del virus a la célula. Además, la proteína VP1 tiene una señal de localización nuclear en su extremo N-terminal, mientras que en el extremo N-terminal de VP2 hay una señal de exportación nuclear. Las proteínas NS1 y NP1 son no estructurales. NS1 está implicada en la replicación y tiene actividad NTPasa y helicasa. Sin embargo se desconoce el rol que cumple NP1 dado que esta no se encuentra en los otros virus de esta familia [2].

La externalización de las secuencias N-terminales tanto de VP1 como de VP2 parecerían ser importantes para la entrada del virus a la célula, la cual se da a través del reconocimiento del receptor en la membrana celular y la posterior endocitosis del virus. La mayoría de los virus de esta familia tienen como células blanco a las células eritroides y sus precursores eritrocitos. Sus receptores son por ejemplo el antígeno P, receptores de transferrina o el ácido siálico para el *Parvovirus* B19, sin embargo hasta ahora no han sido descritos los receptores para el HBoV [2, 3].

Luego de un reconocimiento exitoso el virus es endocitado y liberado en el citoplasma, en la zona perinuclear, con la ayuda de la actividad fosfolipasa A2 de VP1. En el citoplasma se une a los microtúbulos, los cuales transportarán el virión hacia un poro nuclear. Para poder ingresar al núcleo, atravesando los poros nucleares, es necesario que el virión sufra algunos cambios conformacionales para exponer la señal de localización nuclear. Una vez en el núcleo, el ADN viral simple hebra se libera de la cápside y es convertido en doble hebra utilizando la maquinaria celular. Los extremos del genoma viral son doble hebra debido al apareamiento de bases, y el grupo OH del extremo 3' es utilizado por la



polimerasa como cebador para pasar de ADN simple hebra a ADN doble hebra [2, 3].

Para la transcripción el virus utiliza la ARN polimerasa II celular, así como los factores de transcripción celular. El transcripto primario sufre varios eventos de ensamblaje (“*splicing*”, por su nombre en inglés) para producir dos tipos de ARNm: los largos y los cortos. Los ARNm largos transcriben las proteínas no estructurales, mientras que los cortos las estructurales. Las proteínas no estructurales son fosforiladas y son las encargadas de controlar la expresión y la replicación del ADN [2, 3].

La replicación se realiza utilizando la maquinaria celular, incluyendo la ADN polimerasa, por lo que requiere que la célula este en la fase S. El mecanismo utilizado para la replicación se denomina en inglés “*rolling hairpin*”, al final del cual se obtiene una sola molécula de ADN compuesta por varias copias del genoma viral unidas por sus extremos, alternando una copia de ADN de polaridad positiva y otra negativa. En la Fig. 4 se esquematizan los pasos necesarios para la replicación rolling hairpin. En primer lugar se debe obtener el ADN doble hebra, utilizando la horquilla del extremo 3' como cebador (paso 1 de la Fig. 4), luego de la elongación se une covalentemente el extremo 3' con la horquilla del extremo 5' (paso 2 de la Fig. 4). Posteriormente la proteína NS1 mella la cadena 18 nt corriente abajo de donde se encontraba anteriormente el extremo 5' (paso 3 de la Fig. 4) y el OH del extremo 3' sirve como cebador para rellenar el gap producido por el corte que realizó NS1 (paso 4 de la Fig. 4). Después los extremos 3' y 5' de la molécula doble hebra lineal se desnaturalizan para que ambos extremos puedan formar horquillas (paso 5 de la Fig. 4) y el OH del extremo 3' sirve como cebador para replicar nuevamente la molécula de ADN (paso 6 de la Fig. 4), de modo que se forma una estructura dimérica lineal (paso 7 de la Fig. 4). Luego los extremos 5' y 3' de la molécula doble lineal se desnaturalizan para que ambos extremos puedan formar horquillas, y la molécula pueda volver a replicarse para formar una estructura tetramérica lineal (pasos 8 y 9 de la Fig. 4). Se cree que es NS1 la

responsable de desenrollar la molécula de ADN a medida que se va encapsidando el genoma, y también sería la encargada del procesamiento proteolítico de la molécula de ADN, asegurándose de que solamente una copia del mismo sea encapsidado [2, 3].

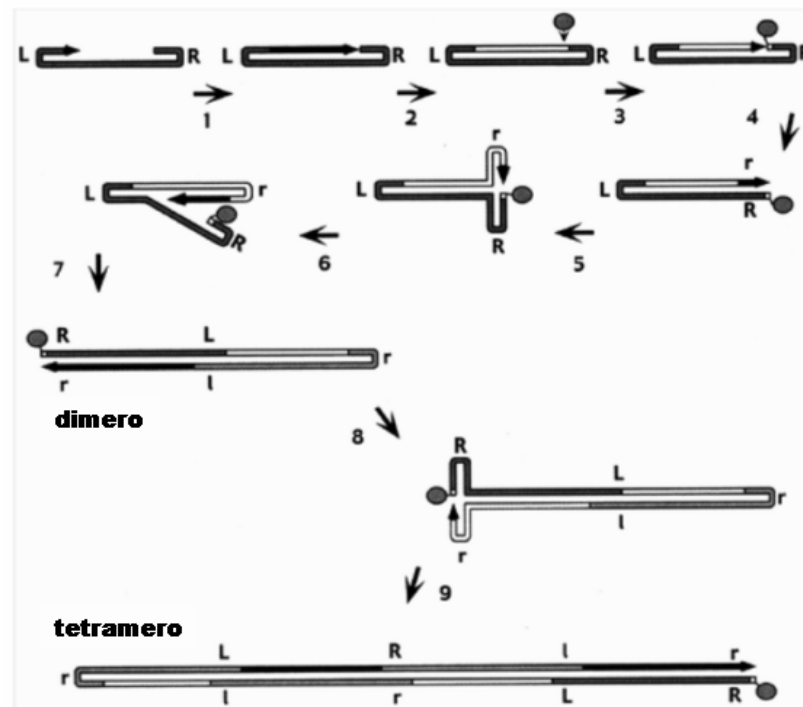


Fig. 4: Esquema del mecanismo de replicación rolling hairpin extraído de Fields' Virology [2]. El genoma viral está representado por una línea continua. El extremo 3' se representa con la punta de una flecha. Las letras L y R indican las secuencias palindrómicas de la izquierda y la derecha, respectivamente. Las letras l y r indican las secuencias complementarias a las secuencias palindrómicas L y R. El círculo negro representa a la proteína NS1.

Las proteínas de la capsida que fueron traducidas en el citoplasma son transportadas al núcleo, donde se ensamblan y se encapsida el ADN. La polaridad del ADN encapsidado depende de cada virus, algunos virus tienen preferencia por algún tipo de polaridad, mientras que otros encapsidan cerca de un 50% de cada uno. Una vez que el virión está ensamblado, este puede ser retenido en el núcleo, traslocado al citoplasma, o transportado fuera de la célula, dependiendo en parte del estado de fosforilación de las proteínas capsídicas [2]. En la Fig. 5 se muestra un esquema del ciclo celular de los parvovirus.

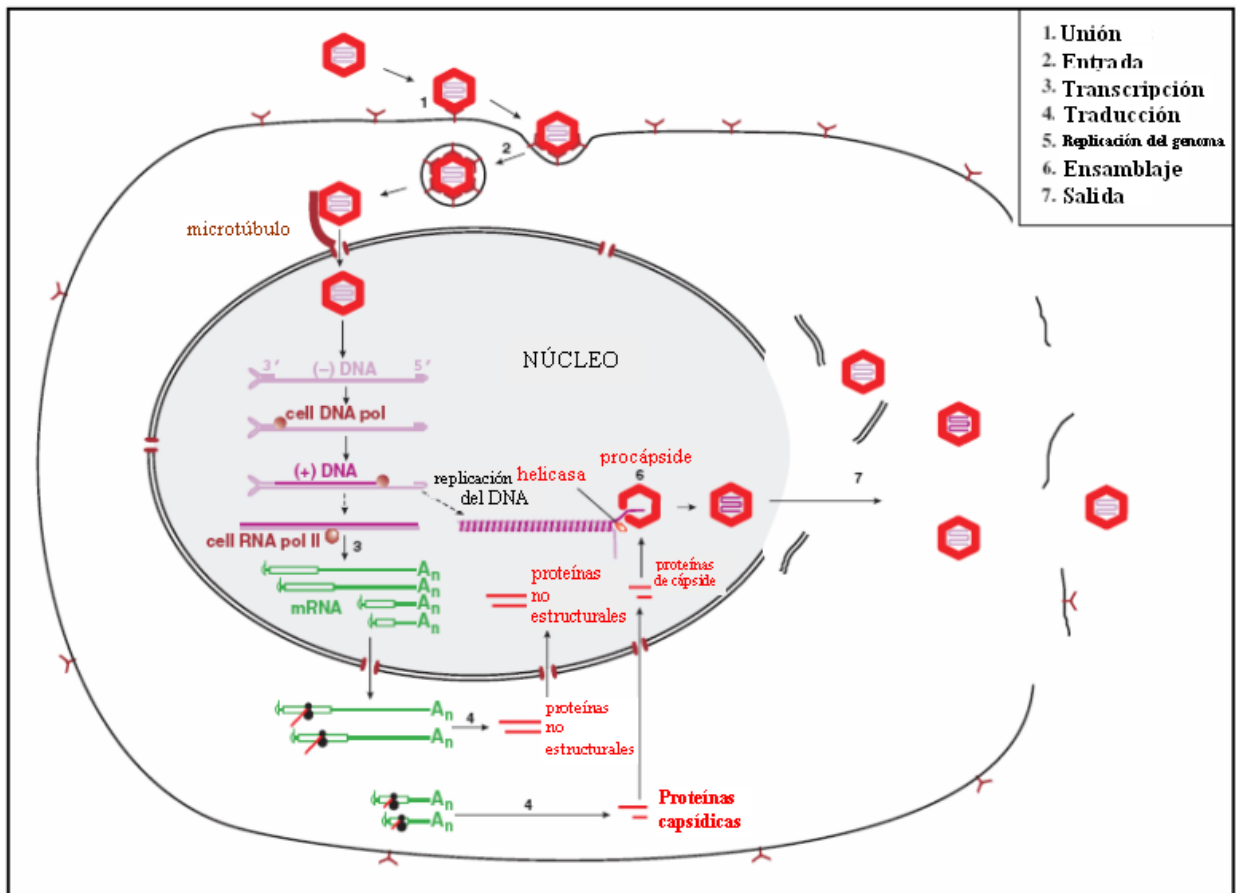


Fig. 5: Esquema del ciclo celular de los parvovirus. Extraído y modificado de “Virology : principles and applications” [3].

Aunque se han hecho esfuerzos por cultivar HBoV en líneas celulares continuas como Vero, HEp-2 y LLC-MK2 [20, 35], esto no se ha logrado. Sin embargo en los Países bajos Dijkman et al., lograron aislar el virus a partir de un cultivo celular primario de epitelio pseudoestratificado de vías aéreas humanas (células bronqueo-traqueales) [5]. Dijkman et al., no observaron prácticamente ningún cambio morfológico entre las células infectadas con HBoV y las células control. Analizando la secuencia genética de los ARNm encontraron que, además de los ORFs ya conocidos de las proteínas VP1, VP2, NS1 y NP1, encontraron otro posible ORF al que denominaron ORFx (Fig. 3).

A través de un software que predice los posibles promotores, el grupo de Dijkman encontró un solo promotor que sería responsable de la transcripción de todos los

ARNm primarios, que luego sufrirían “*splicing*” alternativo para llegar a los ARNm finales.

### **Infecciones por HBoV y respuesta inmune:**

En estudios de infecciones respiratorias la detección clínica de HBoV se realizó principalmente en aspirados nasofaríngeos a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se realizaron experimentos de cuantificación de HBoV a través de real-time PCR [36-38], y se intentó correlacionar las altas y bajas concentraciones virales con distintas sintomatologías clínicas, y aunque se encontró que en los casos de pacientes con neumonía existían altos niveles de HBoV, el número de muestras no permitió extraer conclusiones estadísticamente aceptables [36]. Asimismo no se observó variaciones en la concentración viral en coinfecciones y en monoinfecciones, pero en aquellos casos donde hubo una alta concentración viral en aspirados nasofaríngeos, se encontró la presencia del virus en muestras fecales del mismo paciente [36].

El HBoV también ha sido encontrado en muestras de materia fecal asociado a infecciones entéricas con una frecuencia que va desde 0,9% a 9,1%, con un porcentaje de coinfección con otros patógenos intestinales que va de 21,4% a 58,3% [29, 39, 40].

Los estudios serológicos realizados en sueros de niños y adultos han permitido detectar inmunoglobulinas anti-VP1 y anti-VP2 de HBoV, lo cual permitiría concluir que HBoV no solo puede producir infecciones respiratorias, sino que también sistémicas [41-43]. En el trabajo de Lin et al., [41] sueros de niños de 0 a 9 años de edad fueron analizados para la detección de IgGs. Se observó que a mayor edad, mayor era la proporción de niños con sueros positivos para IgG anti-VP2 de HBoV, llegando a un 59% de sueros positivos en niños mayor de 3 años con infección respiratoria en las vías bajas y al 48% en niños sanos de 4 a 9 años. También fue reportado que los pacientes con aspirados nasofaríngeos positivos para HBoV y con una alta carga viral en los mismos, contenían un alto nivel de

IgG anti-VP2 en el suero. Endo et al., [42] también observaron este aumento en el nivel de IgG en pacientes positivos para HBoV, sin embargo ellos encontraron que a la edad de 6 años el 100% de los pacientes eran positivos para IgG anti-VP1 de HBoV . Esta diferencia puede deberse a que en los dos estudios utilizaron anticuerpos para dos proteínas diferentes (VP1 y VP2) y según se evidencia en el trabajo realizado por el grupo de Shirkoohi [43], los IgG anti-VP1 son más fácilmente detectables que los IgG anti-VP2.

# **Objetivos:**

## **Objetivo general:**

Detectar y analizar la presencia de Bocavirus Humano (HBoV) en una colección de aspirados nasofaríngeos del año 2008 y 2009 de niños hospitalizados con infecciones respiratorias.

## **Objetivos específicos:**

1. Obtención de un stock de control positivo para HBoV, mediante el clonaje de un fragmento del gen NP1 de HBoV.
2. Transformación de bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  de E. coli de New England Biolabs®.
3. Extracción del plásmido y confirmación de la presencia del inserto en los mismos mediante su amplificación por PCR.
4. Extracción de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de los aspirados nasofaríngeos a analizar.
5. Detección por PCR de HBoV en muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos.
6. Secuenciación y análisis de los amplicones obtenidos.

## **Materiales y métodos:**

### **Muestras:**

Se analizaron 99 muestras de aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones respiratorias en las vías bajas, hospitalizados en el Centro Hospitalario Pereira Rossell de los períodos epidémicos para las infecciones respiratorias de 2008 y 2009. Cada muestra se dividió en 2 partes, 400 µl aproximadamente para la extracción de ARN y ADN, mientras que el resto se mantuvo a -80°C para su posible utilización en cultivos celulares.

### **Extracción del ARN total:**

La extracción de ARN se realizó mediante el reactivo de Trizol®. A 400 µl de aspirado nasofaríngeo se les adicionó 300 µl trizol, se las homogenizó agitando vigorosamente y se lo dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14.000 rpm. Se recuperó la fase superior (la inferior y la interfase se guardaron a -80°C para la posterior extracción del ADN) y se le agregó 500 µl de isopropanol. Se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos a 4 °C. A continuación se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 14.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se le añadió 500 µl de Etanol (75%) al sedimento (“*pellet*”, por su nombre en inglés). Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 4°C a 14.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet durante 30 minutos a 37°C. A continuación se resuspendió el “*pellet*” en 11,5 µl de agua Gibco® a 60°C y se dejó durante 5 minutos a esa temperatura. Por último se le agregaron 0,5 µl de inhibidor de RNAsa (40u/ µl) (RNaseOUT®, Invitrogen®) y se conservó el extracto de ARN a -70°C.

### **Extracción del ADN total:**

Se partió de la fase inferior y la interfase Producto de la extracción del ARN total. Se le agregó un volumen y medio de Etanol 95% y se incubó por una hora a -20°C. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14.000 rpm. Se lavó el pellet con

200  $\mu$ l de éter etílico centrifugando por 3 minutos a 14.000 rpm y se retiró el sobrenadante (este paso se repitió 2 veces). Luego se dejó secar el pellet durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se resuspendió el pellet en 400  $\mu$ l de buffer TE con SDS 0,5%, NaCl 100mM y 5  $\mu$ l de Proteinasa K (10mg/ml) y se incubó durante una hora a 60°C. Se agregó 350  $\mu$ l de fenol, se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante un minuto a 14.000 rpm. Se recuperó la fase acuosa. A continuación se agregó un volumen de éter etílico saturado con agua, se mezcló vigorosamente, se centrifugó por 2 minutos a 14.000 rpm y se descartó el éter etílico. Este último paso se realizó dos veces. Luego se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a -70°C por una hora. Se centrifugó por 20 minutos a 15.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se lavó el "pellet" con 500  $\mu$ l de etanol (75%), se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm. y se secó durante 30 minutos a 37°C. Por último se resuspendió el pellet en 16  $\mu$ l de agua Gibco® a 60°C y se incubó durante 5 minutos a esa temperatura. Se guardó el extracto de ADN a -80°C.

## **Obtención del stock de control positivo:**

### **Clonado del gen NP1 de HBoV en pJet 1.2®:**

Para obtener el control positivo fue necesario clonar el gen NP1 a partir de una muestra positiva existente en el laboratorio. Para esto se utilizó el kit pJet 1.2®, y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante se realizó la mezcla de ligación en la cual se mezclaron 10  $\mu$ l de 2x buffer reaction con 2  $\mu$ l de muestra, 1  $\mu$ l de DNA blinding enzyme y 5  $\mu$ l de agua. Esta mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm. Luego se incubó a 70°C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. Posteriormente de 10 minutos se le agregó 1  $\mu$ l de pJet 1.2 y 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa. Se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 segundos. Posteriormente se incubó durante 30 minutos a 22°C.

Para la transformación se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de E. coli de New England Biolabs® (NEB). Se colocaron 25  $\mu$ l de células en un tubo en hielo, y se le agregaron 2,5  $\mu$ l de la mezcla de ligación realizada anteriormente. Se incubó en hielo por 30 minutos, luego 45 segundos a 42°C y por último 5 minutos en hielo.



A continuación se le agregaron 475 µl de medio LB líquido y se incubó por una hora a 37°C con agitación. Finalmente se plaquearon 100 µl de las células transformadas en placas con medio LB con ampicilina (100 mg/ml) y se incubó a 37°C over night.

Luego se picaron 12 de las colonias con tips, y se colocaron los tips en 5 ml de medio LB líquido con 5 µl de ampicilina (100 mg/ml) y se lo incubó con agitación a 37°C, toda la noche. Después de la incubación se tomaron 700 µl de cada uno de los tubos y se le agregaron 300 µl de glicerol para mantenerlo a -80°C para su conservación.

### **Extracción del plásmido:**

La extracción del plásmido se realizó a partir de colonias transformadas utilizando el kit de extracción de NucleoSpin®. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante se centrifugaron 3 ml de bacterias transformadas a 11.000 rpm por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 250 µl de buffer de resuspensión “A1” y se resuspendió el pellet agitando vigorosamente. Luego se le agregaron 250 µl de buffer de lisis “A2” y se mezcló 8 veces por inversión. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se le agregaron 300 µl de buffer de neutralización “A3”. Se mezcló por inversión 8 veces y se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos.

Se colocó una Columna Plasmid QuickPure NucleoSpin® en un tubo colector (de 2 ml) y se colocó un máximo de 750 µl del sobrenadante del paso anterior. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el líquido y se repitió este paso con el sobrenadante restante del paso anterior.

Para lavar la membrana de sílica se le agregaron 450 µl de buffer de lavado “AQ” y luego se centrifugó a 11.000 rpm durante 3 minutos. Se descartó el líquido y se secó la membrana con una centrifugación a 11.000 durante 3 minutos.

Se colocó la Columna Plasmid QuickPure NucleoSpin® en un tubo eppendorf (de 1,5 ml). Se colocaron 50 µl de buffer de elusión “AE”, se incubó durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 11.000 rpm durante un minuto. Las eluciones se guardaron a -20°C hasta su uso.

### **Identificación:**

Para corroborar que el gen NP1 se ligó correctamente al plásmido se realizó la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen NP1. La amplificación se realizó partiendo de 2 µl de las eluciones obtenidas en el paso anterior, a las que se les añadieron 5 µl del buffer 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl del primer 542R (20mM) (5'CTCTGTGTTGACTGAATACAG3') y 1,5 µl del primer 188F (20 mM) (5'GAGCTCTGTAAGTACTATTAC3'), 0,3 µl de polimerasa recombinant Taq. DNA® (5 u/ µl) y 37,2 µl de agua Gibco®, completando los 50 µl de reacción. El ciclado consistió en una incubación inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 54 °C y 35 segundos a 72 °C. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 minutos.

### **PCR de HBoV de las muestras de los años 2008 y 2009:**

Para la amplificación del gen NP1 de HBoV se partió de 4 µl del extracto de ADN, al que se le añadió 5 µl del buffer 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de cada uno de los primers (542R y 188F, ambos con una concentración de 20mM) 0,3 µl de polimerasa recombinant Taq. DNA® (5 u/ µl) y 35,2 µl de agua, completando los 50 µl de reacción. El ciclado consistió en una incubación inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 54 °C y 35 segundos a 72 °C. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 minutos. En el control positivo se utilizó 1 µl del plásmido con el inserto del gen NP1 diluido en 3 µl de agua Gibco®. Para el control negativo se utilizó 4 µl de agua Gibco®.

### **RT-PCR de HBoV de las muestras del año 2009:**

Se realizó la retrotranscripción a partir de 2,5 µl del extracto de ARN, al que se le agregó 1 µl del primer 542R (20 uM), 0,5 µl de dNTPs (10mM) y 2,25 µl de agua. Se lo incubó durante 5 minutos a 65 °C, e inmediatamente en hielo. Luego se le agregaron 2 µl de Buffer 5X first stand [250mM Tris-HCl (pH 8,3 a temperatura

ambiente) 375mM, 15mM MgCl<sub>2</sub>], 1 µl de DTT 0,1M y 0,25 µl de inhibidor de RNAsa (40u/ µl) (RNaseOUT®, Invitrogen®), y se lo dejó durante 2 minutos a 42°C. Por último se agregaron 0,5 µl de la enzima SuperScript II® (40 u/ µl), y se incubó durante 50 minutos a 42°C, seguido de 15 minutos a 70°C.

Posteriormente se amplificó por PCR el gen NP1 a partir de 4 µl del cDNA obtenido, al que se le añadió 5 µl del buffer 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de cada uno de los primers (542R y 188F, ambos con una concentración de 20mM) 0,3 µl de polimerasa recombinant Taq. DNA® (5 u/ µl) y 35,2 µl de agua, completando los 50 µl de reacción. El ciclado consistió en una incubación inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 54°C y 35 segundos a 72°C. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 minutos.

### **Electroforesis en geles de agarosa:**

En geles de agarosa 1% en TBE (tris borato etilendietilamina) fueron sembrados y corridos 8 µl de cada uno de los productos de las PCRs junto con 1,5 µl de buffer de carga (Azul de bromofenol y Xilencianol). La corrida electroforética se realizó a 100v durante 30 minutos. Se utilizó el agente intercalante bromuro de etidio como marcador para la visualización de las bandas, y un marcador de peso molecular de 100 pb como referencia. La presencia o ausencia de bandas se examinó en un transiluminador de luz UV.

### **Purificación:**

Se purificaron los amplificadores positivos obtenidos para HBoV utilizando el kit NucleoSpin Extract II®. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante por cada volumen de muestra se le agregó y mezcló (a cada muestra) dos volúmenes del buffer NT. Se colocó una columna NucleoSpin® Extract II en un tubo de recolección de 2 ml y se cargó la muestra. Luego se centrifugó por un minuto a 11.000 rpm, se descartó el líquido, y se le agregaron 600 µl de buffer NT3.

Después se centrifugó por un minuto a 11.000 rpm y se descartó el líquido. Luego se volvió a centrifugar por 2 minutos a 11.000 rpm para remover el buffer NT3 restante. Se colocó la columna NucleoSpin Extract II en un tubo eppendorf. Se le agregaron 50 µl de buffer de elución NE. Por último se dejó incubarse por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por un minuto a 11.000 rpm. Se mantuvo a -20°C hasta su uso.

### **Secuenciación:**

Los amplificadores purificados de 354pb (correspondientes a una porción del gen NP1, que consta de 659 pb) fueron secuenciados en ambos sentidos con los primers 188F y 542R. La secuenciación fue realizada en un secuenciador automático ABI3730XL ó ABI3700 (Macrogen, Korea).

### **Análisis de secuencia:**

La búsqueda de homología de las secuencias obtenidas fue analizada utilizando el programa BLAST del sitio servidor NCBI (Nacional Center for Biotechnology information). Las secuencias fueron editadas usando el programa BioEdit. El alineamiento múltiple, el cual incluyó una cepa de referencia aislada en San Pablo, Brasil, disponible desde GeneBank (código de acceso: GQ244406.1), se llevó a cabo con el programa ClustalX.

## **Resultados:**

### **Obtención del control positivo:**

Una vez realizado el clonaje y la transformación de las bacterias DH5 $\alpha$ , la extracción del plásmido se realizó con el kit de extracción de NucleoSpin®, como se indica en materiales y métodos. Luego se amplificaron por PCR los insertos de los plásmidos para corroborar la inserción de los mismos.

La electroforesis de esta amplificación se muestra en la Fig. 6 (la amplificación se realizó con los primers 188 F y 542R). Se puede observar que se amplificaron todos los insertos, y que estos son de un tamaño de 350 pb aproximadamente (el largo de la porción amplificada es de 354pb), tal como era esperado. El marcador de peso molecular es de 100 pb.

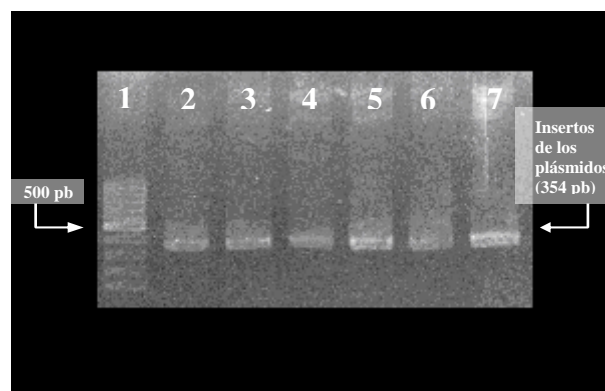


Fig. 6: Foto de la electroforesis de la amplificación de los insertos en los plásmidos pJet. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 al 7: amplicones de los insertos.

### **Amplificación de las muestras de los años 2008 y 2009:**

Se analizaron 57 aspirados nasofaríngeos del año 2008. Se examinó la presencia de HBoV amplificando una porción de 354pb del gen NP1 de un total de 659pb que contiene este gen. De las 57 muestras, 8 fueron positivas para HBoV,

correspondiendo a un 14%. Este porcentaje esta dentro de los rangos reportados. En la Gráfica 1 se detallan la cantidad de muestras totales de los años 2008 y 2009, así como el porcentaje de muestras HBoV positivas respecto al total para cada año.

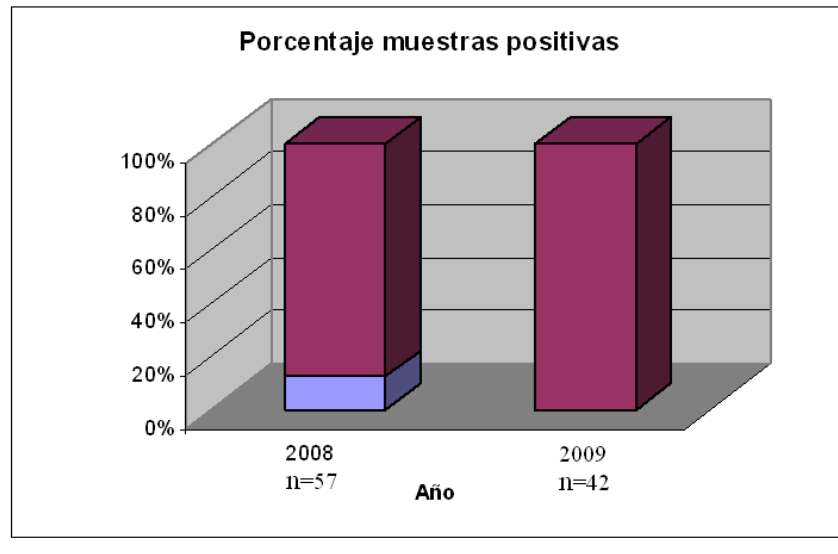
En la Fig. 7 se observa una electroforesis de muestras amplificadas por PCR del año 2008. En ella se puede ver el marcador de peso molecular, el control positivo, y dos muestras positivas para HBoV de 354 pb. Y el control negativo.

Del año 2009 se procesaron 42 aspirados nasofaríngeos, sin embargo no se obtuvo ninguna muestra positiva para HBoV.

Tanto las muestras del año 2008 como las del 2009 fueron analizadas por PCR partiendo de ADN. A las muestras del 2009 también se las analizó por RT-PCR, partiendo de ARN total, para intentar amplificar HBoV a partir de mensajeros virales.



Fig. 7: Foto de la electroforesis de dos muestras positivas de HBoV. C+ representa el control positivo, y C- el control negativo. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 11: muestras negativas. Carriles 5 y 10: muestras positivas. C+: control positivo. C-: control negativo.



Gráfica 1: Gráfica de los porcentajes de las muestras positivas. En el año 2008 hubo un 14% de muestras HBoV positivas. En el año 2009 hubo un 0% de muestras HBoV positivas.

**Purificación:**

En la Fig. 8 se observa la electroforesis de los productos purificados de PCR de las 8 muestras positivas para HBoV. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb.

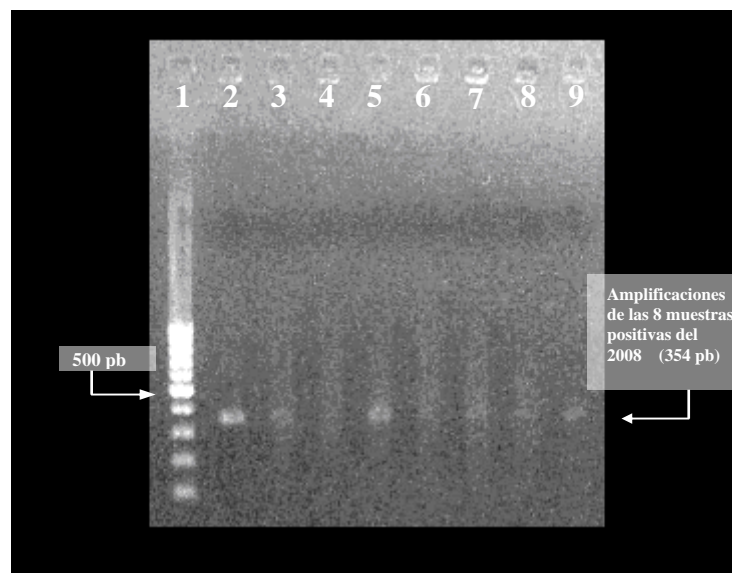


Fig. 8: Electroforesis de las muestras positivas del 2008 purificadas. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles del 2 al 9: muestras HBoV positivas purificadas.

### **Secuenciación:**

Se realizó la secuenciación de las 8 muestras positivas con los primers 542R y 188F (ver materiales y métodos) en el servicio de secuenciación Macrogen de Korea. El fragmento secuenciado fue de 354 pb.

### **Análisis de secuencia:**

Las 8 secuencias de las muestras positivas para HBoV del año 2008 fueron editadas y alineadas usando el programa BioEdit. En la Fig. 9 se puede ver una porción de un cromatograma de una de las muestras y en la Fig. 10 se muestra el alineamiento de las secuencias entre sí, y alineadas a su vez con una cepa aislada en San Pablo, Brasil. Esta secuencia está disponible en GenBank (código de acceso: GQ244406.1). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó una porción de 111 nucleótidos, ya que esta era la porción del cromatograma que tenía mejor resolución.

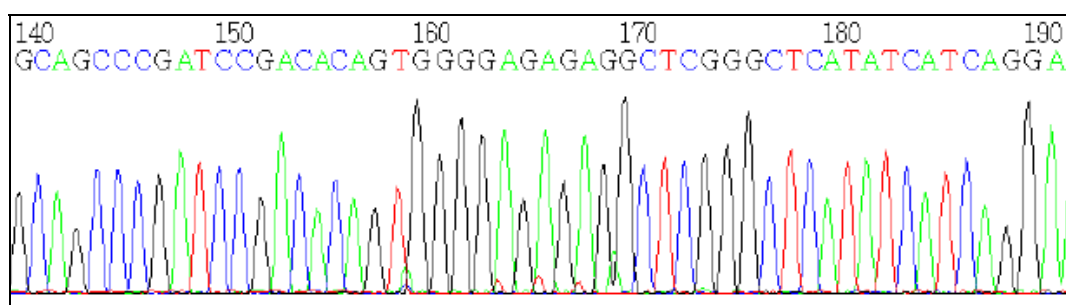


Fig. 9: Fragmento de un cromatograma de una de las muestras positivas para HBoV del 2008



	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35
BR719	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 1	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 2	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 3	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 4	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 5	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 6	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 7	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
URU 8	TGTAAGTACT	ATTACTTTCT	TTAACACTTG	GCACGCACAG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	45	55	65	75
BR719	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 1	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 2	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 3	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 4	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 5	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 6	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 7	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
URU 8	CCACGTGACG	AAGATGAGCT	CAGGGAATAT	GAAAGACAAG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	85	95	105	.
BR719	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 1	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 2	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 3	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 4	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 5	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 6	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 7	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G
URU 8	CATCGCTCCT	ACAAAAGAAA	AGGGAGTCCA	G

Fig. 10: Alineamiento de las secuencias de las muestras positivas del 2008 y la secuencia de una cepa aislada en Brasil de referencia BR719 (código de acceso: GQ244406.1).

## **Discusión y conclusiones:**

Dadas las dificultades para diagnosticar las infecciones respiratorias por HBoV tanto por los síntomas clínicos, como por cultivo celular y por inmunofluorescencia, en este trabajo se utilizaron técnicas moleculares (PCR y RT-PCR) para la detección de HBoV partiendo de muestras clínicas correspondientes a niños con infecciones respiratorias en las vías bajas. Las muestras clínicas consistieron en aspirados nasofaríngeos, a las cuales se les realizó las extracciones de ADN viral y de ARN total.

Asimismo, como consecuencia de este trabajo, se obtuvo un gran stock de control positivo para HBoV como resultado del clonado de una porción del gen NP1 en bacterias *E. coli* transformadas. Este stock queda disponible para ser utilizado en futuros trabajos.

Se analizaron un total de 99 muestras clínicas, 57 de las cuales correspondieron al año epidémico 2008 y 42 al 2009. Para la detección de HBoV se amplificó una porción de 354 pb de los 659 que tiene el gen NP1.

En nuestro estudio se comenzó analizando las 42 muestras del año 2009 a través de PCR partiendo de ADN, que es la forma usual para la detección de HBoV, ya que el genoma de este virus es de ADN. Sin embargo, cuando no se pudo amplificar HBoV en ninguna de las muestras del 2009 se las analizaron a través de RT-PCR partiendo de la extracción del ARN total de las muestras de forma de intentar amplificar el ARNm del gen NP1 viral teniendo en cuenta un trabajo previo realizado en el laboratorio.

Una vez procesadas las muestras del año 2009 se procedió a amplificar las 57 muestras correspondientes al año 2008. Estas fueron analizadas únicamente a través de PCR partiendo de la extracción de ADN total de los aspirados nasofaríngeos.

Se detectaron 8 muestras positivas, lo que corresponde a un 14% de HBoV en las muestras estudiadas. Este porcentaje es similar al encontrado en Alemania [37], donde se encontró una prevalencia de 12,8%; en Brasil [45], con una prevalencia del 13,2% y en España [28], con una prevalencia del 17,1%.

En las 42 muestras del año 2009 no se encontraron muestras positivas para HBoV. Este resultado se correlaciona con el obtenido en los trabajos de Akiyoshi et al. [46] y Nakamura et al. [47], donde se encontró una disminución de la prevalencia de los diferentes virus respiratorios, con la excepción del virus de la influenza A H1N1, durante la pandemia del 2009 de dicho virus. A pesar de que en nuestro trabajo las muestras del 2009 fueron testeadas únicamente para HBoV, teniendo en cuenta estos datos se podría pensar que la pandemia del virus de la influenza A H1N1 del año 2009 generó un desbalance en los porcentajes de circulación de los restantes virus respiratorios, resultando en una menor detección de estos últimos.

Los amplicones obtenidos de las muestras positivas fueron purificados y secuenciados en el servicio de secuenciación Macrogen de Korea. Una vez obtenidas las secuencias se realizó un análisis rápido de homología utilizando el programa BLAST del sitio servidor NCBI (Nacional Center for Biotechnology information), en donde se comprobó que todas las secuencias presentaban una homología de 99% con cepas de HBoV depositadas en GenBank.

Posteriormente, se realizaron los análisis de secuencia utilizando los programas BioEdit y ClustalX. Para este análisis se utilizó un fragmento de solamente 111 nucleótidos, dado que era la porción de la secuencia que tenía mejor resolución en el cromatograma.

Como se puede observar en la Fig. 10, todas las secuencias amplificadas tienen un 100% de homología entre si y con la secuencia obtenida de la base de datos. Esto se debe a que el gen NP1 es un gen altamente conservado, presentando una baja variabilidad. Un estudio sobre VP1/2, que transcribe una proteína capsídica, la cual presenta una gran tasa de mutación, permitiría realizar estudios de variabilidad.

Hasta el momento no está claro si HBoV es el agente causal en las infecciones respiratorias o si es un virus oportunista, sin embargo en este trabajo se detectó su presencia en un porcentaje considerable en las muestras analizadas, siendo este similar al descrito en la bibliografía existente.

Las muestras estudiadas en este trabajo también fueron objeto de estudio en un trabajo que se realizó en paralelo en el laboratorio, en donde se buscaba la

presencia de Adenovirus, el cual es un virus que también causa infecciones respiratorias y es responsable de un alto porcentaje de las hospitalizaciones de niños menores 3 años. Comparando los resultados para cada una de las muestras en cada uno de los análisis, se encontró que 2 de las 8 muestras positivas de HBoV también fueron Adenovirus positivas, lo que nos da un 3,5% de coinfecciones en las 57 muestras del 2008. Del mismo modo se puede observar que el 25% de las muestras positivas para HBoV son coinfecciones (2 de las 8 muestras positivas), lo que es una tasa de coinfección muy alta, teniendo en cuenta que las muestras se analizaron únicamente para HBoV y Adenovirus (Gráfica 2).

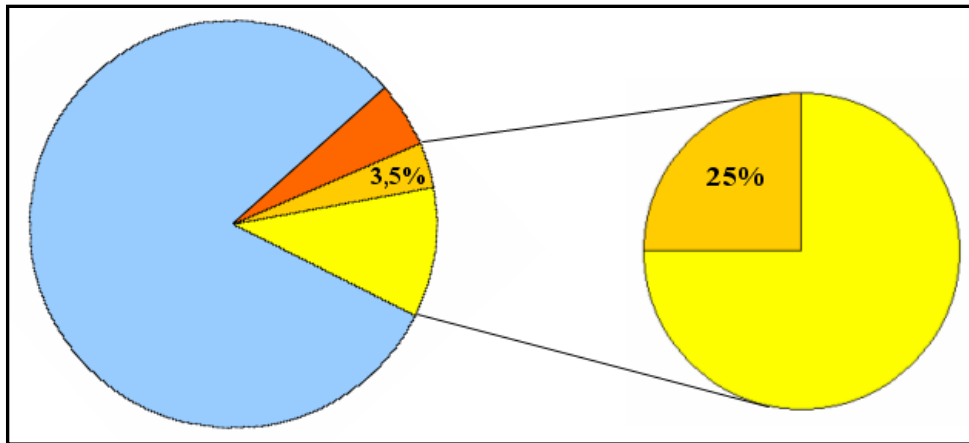


Gráfico 2: Gráfica de las 57 muestras analizadas en el 2008.

- + ■ = Total de muestras HBoV positivas. (8 muestras)
- + ■ = Total de muestras ADV positivas. (5 muestras)
- = Muestras coinfectadas HBoV y ADV positivas. (2 muestras)

Para poder calcular la tasa real de coinfectividad de HBoV restaría realizar la detección de otros virus respiratorios, como por ejemplo hVRS y Metapneumovirus Humano, en los aspirados nasofaríngeos tanto del 2008 como del 2009. Este proceso está siendo llevado a cabo actualmente en el laboratorio, el cual implicó realizar nuevamente la extracción de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) a partir de las 8 muestras positivas a fin de obtener cantidad de material suficiente que permita amplificar y detectar los posibles virus coinfectantes. Asimismo se utilizarán las extracciones de ADN para la amplificación de los

genes VP1 y VP2 y de esta forma poder realizar un estudio de variabilidad de los virus HBoV circulantes en Uruguay.

Dado el alto porcentaje de coinfecciones de HBoV con otros virus respiratorios [26-28,33] es que surge la duda acerca de si HBoV es el responsable directo de las infecciones respiratorias, o si en realidad se trata de un virus oportunista, que aprovecha las bajas defensas del individuo enfermo para infectar. Una posible respuesta a esta interrogante podría provenir del estudio de un mayor número de muestras (inclusive de diferentes años) a fin de detectar HBoV, así como los otros virus respiratorios reportados como coinfectantes.

Un futuro trabajo sería no solo obtener muestras de niños con infección respiratorias sino que a estos mismos se le deberían tomar muestras de materia fecal y analizar la presencia de HBoV en los dos tipos de muestras clínicas ya que se ha reportado que podría existir una relación entre la infección por HBoV de las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal [29]. De esta forma se podrá tener una comprensión más cabal del comportamiento de este virus y su rol como posible agente patogénico.

## **Bibliografía:**

1. Fauquet, C. and International Committee on Taxonomy of Viruses., *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses ; 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2005, Oxford: Elsevier/Academic Press. viii, 1259.
2. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields' virology*. 5th ed. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2 v. (xix, 3091, 86 ).
3. Carter, J.B. and V.A. Saunders, *Virology : principles and applications*. 2007, Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xix, 358.
4. Prats, G., *Micribiología Clínica*. Primera ed. 2005: Editorial médica panamericana.
5. Dijkman, R., Koekkoek, S., Molenkamp, R., Schildgen, O., van der Hoek, L., *Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells*. J Virol, 2009. **83**(15): p. 7739-48.
6. Reyes, M.A., G. Aristizábal, and F.J. Leal, *Noumología pediátrica. Infección, alergia y enfermedad respiratoria en el niño*. Quinta ed. 2006: Editorial médica Panamericana.
7. Rosa, M.d.l. and J.P. Prieto, *Microbiología en ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones*. Segunda ed. 1997: Elsevier.
8. Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R., *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1147-52.
9. Fernandez, M., González, G., Cuevas, A., Llerena, M., Reyes, S., Martínez, N., *Neumonías adquiridas en la comunidad en cuidados intensivos pediátricos*. Revista cubana de medicina intensiva y emergencias., 2009. **8**(2): p. 1505-1517.
10. Monto, A.S. and K.M. Sullivan, *Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved*. Epidemiol Infect, 1993. **110**(1): p. 145-60.
11. Henrickson, K.J., Hoover, S., Kehl, K.S., Hua, W., *National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(1 Suppl): p. S11-8.

12. Maffey, A.F., Venialgo, C., Barreo, P., Fuse, V., Márques, M., Saia, M., Villalba, A., Teper, A., Mistchenko, A., *New respiratory viruses in children 2 months to 3 years old with recurrent wheeze*. Arch Argent Pediatr, 2008. **106**(4): p. 302-9.
13. Ringshausen, F.C., Tan, A.M., Allander, T., Borg, I., Arinir, U., Kronsbein, J., Hauptmeier, B., Schultze-Werninghaus, G., Rohde, G., *Frequency and clinical relevance of human bocavirus infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2009. **4**: p. 111-7.
14. Arnold, J.C., Singh, K.K., Spector, S.A., Sawyer, M.H., *Undiagnosed respiratory viruses in children*. Pediatrics, 2008. **121**(3): p. e631-7.
15. Weissbrich, B., Neske, F., Schubert, J., Tollmann, F., Blath, K., Blessing, K., Kreth, H.W., *Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 109.
16. Dominguez, S.R., Briese, T., Palacios, G., Hui, J., Villari, J., Kapoor, V., Tokarz, R., Glodé, M.P., Anderson, M.S., Robinson, C.C., Holmes, K.V., Lipkin, W.I., *Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade*. J Clin Virol, 2008. **43**(2): p. 219-22.
17. Ochoa Sangrador, C. and J. Gonzalez de Dios, *Consensus conference on acute bronchiolitis (II): epidemiology of acute bronchiolitis. Review of the scientific evidence*. An Pediatr (Barc), 2010. **72**(3): p. 222 e26.
18. Shek, L.P. and B.W. Lee, *Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics*. Paediatr Respir Rev, 2003. **4**(2): p. 105-11.
19. Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B., *Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(36): p. 12891-6.
20. Ma, X., Endo, R., Ishiguro, N., Ebihara, T., Ishiko, H., Ariga, T., Kikuta, H., *Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1132-4.
21. Bastien, N., Brandt, K., Dust, K., Ward, D., Li, Y., *Human Bocavirus infection, Canada*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(5): p. 848-50.

22. Foulongne, V., Olejnik, Y., Perez, V., Elaerts, S., Rodière, M., Segondy, M., *Human bocavirus in French children*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(8): p. 1251-3.
23. Lin, J.H., Chiu, S.C., Lin, Y.C., Chen, H.L., Lin K.H., Shan, K.H., Wo, H.S., Liu, H.S., *Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan*. J Clin Virol, 2009. **44**(3): p. 219-24.
24. Qu, X.W., Duan, Z.J., Qi, Z.Y., Xie, Z.P., Gao, H.C., Liu, W.P., Huang, C.P., Peng, F.W., Zheng, L.S., Hou, Y.D., *Human bocavirus infection, People's Republic of China*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(1): p. 165-8.
25. Naghipour, M., Cuevas, L.E., Bakhshinejad, T., Dove, W., Hart, A., *Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections*. J Med Virol, 2007. **79**(5): p. 539-43.
26. Kaplan, N.M., Dove, W., Abu-Zeid, A., Shamoan, H.E., Abd-Eldayem, S.A., Hart, C.A., *Human bocavirus infection among children, Jordan*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(9): p. 1418-20.
27. Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niestars, H.G.M., Lehtinen, P., üsterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B.G., Hyypiä, P., Ruuskanen, O., *Human bocavirus and acute wheezing in children*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(7): p. 904-10.
28. Garcia-Garcia, M.L., Calvo, C., Pozo, F., Vázquez, M.C., González, A., Pérez-Breña, P., Casas, I., *Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus*. An Pediatr (Barc), 2007. **67**(3): p. 212-9.
29. Vicente, D., Cilla, G., Montes, M., Pérez-Yarza, E.G., Pérez-Trallero, E., *Human bocavirus, a respiratory and enteric virus*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(4): p. 636-7.
30. Moriyama, Y., Hamada, H., Okada, M., Tsuchiya, N., Maru, H., Shirato, Y., Maeda, Y., Hirose, Y., Yoshida, M., Omura, M., Honda, T., Muto, A., Hayashi, K., Terai, M., *Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years*. Eur J Pediatr. **169**(9): p. 1087-92.
31. Esposito, S., Bosis, S., Niesters, H.G.M., Tremolati, E., Sabatini, C., Porta, A., Fossali, E., Osterhaus, A.D.M.E., Principi, N., *Impact of human bocavirus on children and their families*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1337-42.



32. Choi, E.H., Lee, H.J., Kim, S.J., Eun, B.W., Kim, N.H., Lee, J.A., Lee, J.H., Song, E.K., Kim, S.H., Park, J.Y., Sung, J.Y., *The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(5): p. 585-92.
33. Fry, A.M., Lu, X., Chittaganpitch, M., Peret, T., Fischer, J., Dowell, S.F., Anderson, L.J., Erdman, D., Olsen, S.J., *Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand*. J Infect Dis, 2007. **195**(7): p. 1038-45.
34. Murray, P.R., *Medical microbiology*. 4th ed. 2002, St. Louis: Mosby. x, 826.
35. Zhang, L.L., Tang, L.Y., Xie, Z.D., Tan, X.J., Li, C.S., Cui, A.L., Ji, Y.X., Xu, S.T., Mao, N.Y., Xu, W.B., Shen, K.L., *Human bocavirus in children suffering from acute lower respiratory tract infection in Beijing Children's Hospital*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(17): p. 1607-10.
36. Neske, F., Blessing, K., Tollmann, F., Schubert, J., Rethwilm, A., Kreth, H.W., Weissbrich, B., *Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2116-22.
37. Kleines, M., Scheithauer, S., Rackowitz, A., Ritter, K., Häusler, M., *High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(3): p. 1032-4.
38. Lu, X., Chittaganpitch, M., Olsen, S.J., Mackay, I.M., Sloots, T.P., Fry, A.M., Erdman, D.D., *Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(9): p. 3231-5.
39. Albuquerque, M.C., Rocha, L.N., Benati, F.J., Soares, C.C., Maranhão, A.G., Ramírez, M.L., Erdman, D., Santos, N., *Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(11): p. 1756-8.
40. Chieochansin, T., Thongmee, C., Vimolket, L., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., *Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls*. Jpn J Infect Dis, 2008. **61**(6): p. 479-81.
41. Lin, F., Guan, W., Cheng, F., Yang, N., Pintel, D., Qiu, J., *ELISAs using human bocavirus VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HBoV*. J Virol Methods, 2008. **149**(1): p. 110-7.

42. Endo, R., Ishiguro, N., Kikuta, H., Teramoto, S., Shirkoohi, R., Ma, X., Ebihara, T., Ishiko, H., Ariga, T., *Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(10): p. 3218-23.
43. Shirkoohi, R., Endo, R., Ishiguro, N., Teramoto, S., Kikuta, H., Ariga, T., *Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera*. Clin Vaccine Immunol. **17**(1): p. 190-3.
44. Masner, M., *Estudio retrospectivo de detección de Virus Respiratorio Sincitial, Metapneumovirus Humano y Bocavirus Humano a partir de aspirados nasofaríngeos*, Universidad de la Republica.
45. Pilger, D.A., Cantarelli, V.V., Amantea, S.L., Leistner-Segal, S., *Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz. **106**(1): p. 56-60.
46. Akiyoshi, K., T. Tamura, and T. Haruta, *Virus-related lower respiratory inflammation: detection of human metapneumovirus from severe pneumonia cases with A/H1N1pdm virus*. Jpn J Infect Dis. **64**(1): p. 89-91.
47. Nakamura, M., Taira, K., Tsukagoshi, H., Itokazu, K., Nidaira, M., Okano, S., Kudaka, J., Noda, M., Takeda, M., Kimura, H., *Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa*. Jpn J Infect Dis. **64**(1): p. 87-9.