

La aparición de Bocavirus Humano asociado con las infecciones respiratorias agudas en niños de 0 a 2 años de edad en Belém (Estado de Pará, Brasil)

Ocorrência de Bocavírus Humano associado às infecções respiratórias agudas em crianças de 0 a 2 anos de idade na Cidade de Belém, Pará, Brasil

Occurrence of Human Bocavirus associated with acute respiratory infections in children up to 2 years old in the City of Belém, Pará State, Brazil

Allan Kaio Silva
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brasil

Wyller Alencar de Mello
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Mirleide Cordeiro dos Santos
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Rita Catarina Medeiros de Sousa
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brasil

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las infecciones respiratorias agudas (IRA) siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. La gran mayoría de estas infecciones están asociadas con diversos patógenos, entre los que los virus son prevalentes. Recientemente, un nuevo parvovirus llamado Bocavirus Humano (BovH) fue descrito. Las investigaciones son todavía escasas sobre la asociación de este nuevo agente con casos de IRA en la población en general. En este contexto, este artículo relata la investigación de BovH en un segmento de la población de la Amazonía. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Este estudio analizó las muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes con diagnóstico de IRA atendidos ambulatoriamente en Belém (Pará, Brasil). La investigación e identificación de laboratorio del virus se realizó empleando la técnica de reacción en cadena de polimerasa, utilizando pares de oligonucleótidos específicos, seguida de un análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos encontradas. **RESULTADOS:** De las 397 muestras clínicas analizadas, dieron positivo las muestras de tres pacientes, de las que una era una coinfección con el virus respiratorio sincicial. **DISCUSIÓN:** El porcentaje de resultados positivos obtenidos con la investigación demostró ser inferior a lo descrito por la literatura. Sin embargo, cabe señalar que los estudios anteriores se hicieron con pacientes hospitalizados, a diferencia del grupo de población aquí estudiado. El análisis filogenético reveló una considerable similitud de los virus encontrados con las cepas de virus ya descritos. **CONCLUSIÓN:** Esta investigación, se caracteriza por ser el primer informe que asocia el BovH con el IRA en la Región Amazónica.

Palabras claves: Infecciones del Sistema Respiratorio; Bocavirus; Infecciones por Parvoviridae.

INTRODUCCIÓN

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) permanecen como uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, dada su alta morbilidad y mortalidad, principalmente en países en desarrollo^{7,28}. Estas infecciones generalmente se encuentran asociadas a diversos patógenos, teniendo a los virus como prevalentes^{6,13}.

Entre estos podemos citar los virus Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2 y 3 (HPIV), Adenovirus (AdV), Virus Respiratorio Sincicial (VRS), Rinovirus (HRV), Coronavirus (HCoV) y el Metapneumovirus Humano (hMPV)^{3,18}.

Varios estudios continúan siendo conducidos con el objetivo de determinar la etiología de las infecciones del trato respiratorio, siendo que en 12% a 39% de los casos ningún agente conocido es encontrado. Basado en eso, Allander et al² describieron el desarrollo de una nueva metodología fundamentada en técnicas de biología molecular, para investigación de posibles nuevos agentes relacionados a infecciones del trato respiratorio, a partir de la cual detectó un parvovirus previamente denominado Bocavirus Humano (HBoV), clasificado taxonómicamente dentro del género *Bocavirus*, subfamilia *Parvovirinae*, familia *Parvoviridae*^{2,14}.

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

Allan Kaio Silva
Universidade Federal do Pará
Núcleo de Medicina Tropical
E-mail: alansilva@iec.pa.gov.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Rocio Tamara (resumen) y Lota Moncada (artículo)

El HBoV es un virus carente de envoltorio, de simetría icosaédrica, que mide de 18 a 26 nm. de diámetro, con cápside formada por cerca de 60 capsómeros. El genoma viral se presenta no segmentado, compuesto por ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadena simple, sentido positivo y negativo con aproximadamente 5.3 Kb. Posee tres matrices de lectura (ORFs) codificando cuatro proteínas: VP1 y VP2 proteínas estructurales del virión; NS1, proteína no estructural; y la nucleoproteína NP1, de función desconocida.

Estudios han demostrado que el HBoV aparentemente posee una distribución mundial^{5,9,11,16,23,25,27}, con una frecuencia que varía de 1,5%⁵ a 19%¹. Pocos estudios han sido realizados en América Latina con relación a la asociación del HBoV a otras infecciones respiratorias. Merece destaque el alto porcentual (5 - 85%) en que este virus se encuentra como coinfección, tanto con virus, como con otros patógenos^{12,25,27}.

La transmisión del HBoV se muestra indefinida, dado haber sido encontrado, diversas veces, en el trato respiratorio^{5,9,23,27}, suero¹⁵, sangre^{1,17}, orina²⁴ y en gastroenteritis^{4,24}; sin embargo, estudios muestran que el HBoV es el cuarto agente más frecuentemente detectado en pacientes de hasta 2 años de edad, hospitalizados con cuadro de infección del trato respiratorio inferior^{1,24}, sugiriendo que la vía aérea es la principal vía de transmisión.

La sintomatología observada en los casos de infección por HBoV incluye la de un resfriado común, con fiebre y rinorrea, y también silbidos y disnea. En la ocurrencia de complicaciones, generalmente se registra el desarrollo de bronquitis, bronquiolitis y neumonía^{11,20,23}. Estudios sugieren que el HBoV puede establecer infecciones latentes o persistentes de linfocitos de la mucosa, o contribuir para hiperplasia tonsilar²².

El perfil estacional de los casos de infección por el HBoV todavía no está bien establecido. No obstante, en los países de clima templado la ocurrencia de este virus es más acentuada en el invierno y el inicio de la primavera^{11,27}.

Hasta el momento, estudios muestran la existencia de tres tipos de HBoV (HBoV1, HBoV2 y HBoV3) siendo que el tipo 3 solo ha sido encontrado en heces⁴ y el tipo 2 encontrado en sangre y heces^{4,17}. Asociado a IRA, aparece tan sólo el HBoV1.

Con relación a la variabilidad genética, Allander et al² describieron dos cepas (ST1 e ST2) muy conservadas. Este virus parece ser muy estable, con pocas mutaciones demostradas en las secuencias de los genes VP1 y VP2. Las divergencias observadas en las secuencias nucleotídicas son causadas por mutaciones puntuales, que resultan en pocos cambios en la cadena aminoacídica^{16,25}.

En los países de clima tropical, así como Brasil, se han hecho pocas investigaciones sobre la ocurrencia de HBoV, bien como de su variabilidad genética. Delante de este contexto, se refuerza la necesidad de la realización de estudios que posibiliten la generación de datos epidemiológicos sobre este agente, para mejor definir el papel del HBoV en los casos de IRA en la Amazonía.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN ESTUDIADA

Entre los años de 2004 a 2007, muestras de swab combinado (narina/garganta) y aspirado nasofaríngeo fueron colectadas en ambulatorio por el Sistema de Vigilancia Viroológica de la Red de Influenza, del Laboratorio de Virus Respiratorios (LVR) del Instituto Evandro Chagas (IEC). Se hizo una selección entre niños con hasta dos años de edad, que presentaban señales y síntomas de IRA con hasta cinco días de evolución.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras colectadas fueron centrifugadas a 1.000 rpm durante 10'. Con los sedimentos del centrifugado, se prepararon láminas siguiendo la orientación del kit comercial *Light Diagnostics™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification* IFA para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizadas para la investigación del virus Influenza A y B, Parainfluenza 1-3, Adenovirus y VRS. El sobrenadante fue utilizado para intento de aislamiento del HBoV por técnicas de biología molecular.

IDENTIFICACIÓN POR BIOLOGÍA MOLECULAR

Para la extracción, se estandarizó un protocolo por el cual, inicialmente, se colocó en un microtubo 150 µL de tampón TNE (Tris-Na-EDTA), 20 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 10 µL de proteinasa K (10mg/ml) sumado a 120 µL de la muestra. Se incubó a una temperatura de 56° C por 30' en termobloc (Eppendorf). Posteriormente, fueron añadidos 200 µL de fenol saturado, seguido de agitación durante 1' en vortex y centrifugado a 10.000 rpm a 20° C por 3'. Se transfirieron 150 µL del sobrenadante para un microtubo conteniendo 150 µL de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico. Nuevamente la mezcla se agita en vortex por 1' y se centrifuga a 10.000 rpm a 20° C por 3'. Se transfirieron 100 µL del sobrenadante para un microtubo conteniendo 100 µL de cloroformo, se agitó en vortex por 1' y se centrifugó por 10.000 rpm a 20° C por 3'. Por fin, se retira cuidadosamente 40 µL del sobrenadante, siendo conservado a temperatura de -20° C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se dio utilizando pares de oligonucleotidos específicos BoV 118F, BoV 542R (NP1); VP+/1, VP-/726 (VP1) y VP+/1005, VP-/2072 (VP2), conforme a los iniciadores y tamaños del amplicón, se encuentra en el cuadro 1.

Oligonucleotideos	Secuencia	Tamaño del amplicón
BoV 118F BoV 542R	5'GAGCTCTGTAAGTACTATTAC3' 5'CTCTGTGTTGACTGAATACAG 3'	354 pb
VP+/1 VP-/726	5'GCTGCTGAAAGCATGGAAGCA3' 5'GGCGCTGCCAATCCTGTGGT3'	725 pb
VP+/1005 VP-/2072	5'GCTGGAGGCAATGCTACAGAA3' 5'TCCGCTGTCCATTGAGGAGG3'	1067 pb

Cuadro 1 – Descripción de los iniciadores

Para todos los genes, se usó reacción con volumen final de 50 µL conteniendo: 5 µL del DNA extraído, 0,5 µL de cada iniciador (50 pmol/µL), 5 µL de tampón de reacción (10x), 2µL de dNTP (5 mM), 5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,25 U de Taq DNA polimerasa y 31,5 µL de agua libre de DNase/RNase. El programa adoptado fue el especificado por Allander et al².

Muestras PCR positivas para HBoV fueron examinadas para el gen VP1/VP2 habiendo sido preparadas para la secuenciación parcial con el *Kit Big Dye® terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem)* siguiendo instrucciones del fabricante, y secuenciado utilizando el secuenciador automático ABIPrism 3130xl (*Applied Biosystem*).

Todas las reacciones fueron realizadas en termociclador automático *Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf)* siempre con controles negativos y positivos, a fin de evitar contaminación con DNA exógeno.

ANÁLISIS Y EDICIÓN DE LAS SECUENCIAS Y CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO

Las secuencias nucleotídicas obtenidas del HBoV se analizaron y editaron utilizando el programa BioEdit v 7.0, y comparadas a secuencias de otros virus aislados y disponibles en el banco de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando los programas Clustal W v 1.7²⁶ y Mega v 3.1²¹. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizándose el método *neighbor joining* (NJ), implementado en el programa Mega v 3.1. La matriz de distancia en el método de NJ se calculó a partir de las secuencias alineadas usando la fórmula de dos parámetros de Kimura¹⁹. El análisis de *bootstrap* usando 2 mil réplicas fue utilizado para generar una mayor confiabilidad en los valores de los grupamentos¹⁰.

RESULTADOS

Se analizaron 397 muestras, y se obtuvo positividad comprobada por secuenciación para infección por HBoV en tres de ellas (0,76%).

En todos los casos positivos se observó la infección en el período no lluvioso, acometiendo a niños de sexo masculino, con edad de 29 semanas, en promedio, y que en todos los casos, presentaban coriza y tos. Un caso mostró coinfección HBoV/VRS; el niño presentaba también fiebre y congestión nasal (Cuadro 2).

Paciente	Fecha colecta de la muestra	Edad	Sexo	Síntomas	Coinfección
099-04	12/8/2004	9 meses	Masculino	Coriza, tos	No
934-07	14/8/2007	6 meses	Masculino	Coriza, tos, fiebre, obstrucción nasal	VRS
619-07	25/10/2007	8 meses	Masculino	Coriza, tos	No

Cuadro 2 – Datos de los pacientes con infección por HBoV

Con relación al análisis filogenético, el acompañamiento NP1 mostró 100% de similitud cuando comparado a las cepas descritas por Allander et al². Por ocasión del análisis de las secuencias del gen VP1/VP2, una muestra fue secuenciada en la que se observó similitud de 98,3 a 99,7%, comparada a las secuencias de cepas disponibles en el GenBank (Figura 1).

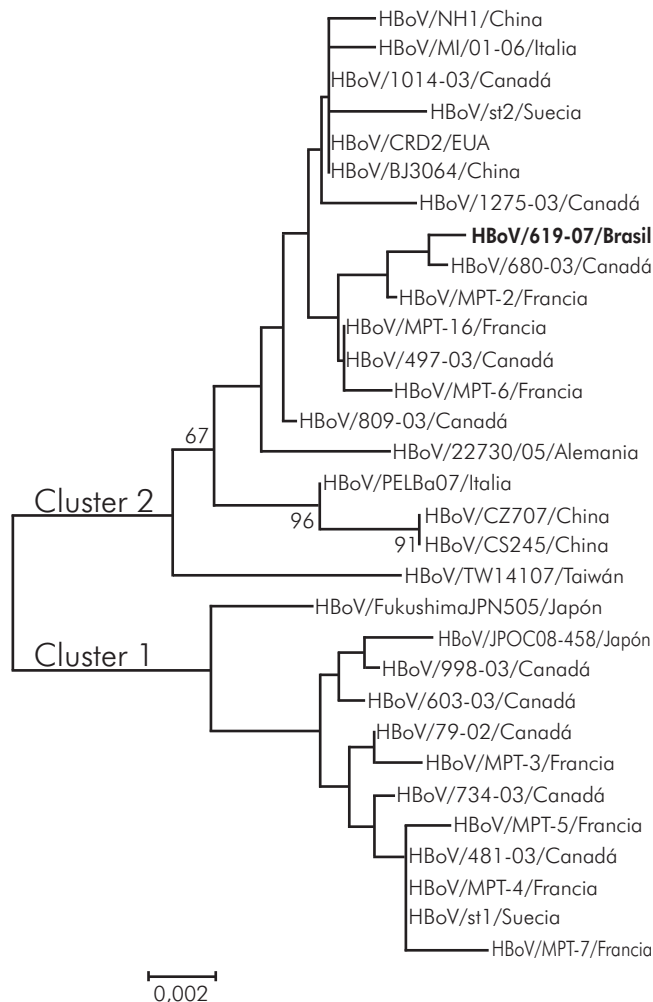


Figura 1 – Análisis filogenético de la secuencia parcial del gen codificador de las proteínas de superficie VP1/VP2 de HBoV. El árbol filogenético fue generado por el método de NJ utilizando el programa Mega v 3.1. Fueron otorgados valores de *bootstrap* (X 2000) a los nudos seleccionados

DISCUSIÓN

Entre enero de 2004 y diciembre de 2007, se diagnosticaron tres casos de infección respiratoria aguda (0,76%) asociados al Bocavirus Humano, en la Ciudad de Belém, Pará. Dos muestras se detectaron en el año de 2004 y la otra en 2007.

Estos datos revelan un porcentual bajo de positividad para HBoV, cuando comparado con datos disponibles en la literatura, los que refieren frecuencia de detección en hasta 19% de los casos investigados¹. Vale resaltar, sin embargo, que las muestras de este estudio, son originarias de pacientes atendidos en ambulatorio, distinto a los estudios en los que fueron halladas tasas mayores de asociación, ya que estos abarcaban a pacientes hospitalizados^{9,27}.

La baja positividad hallada no permitió inferir estándares epidemiológicos de prevalencia y estacionalidad ocasionados por el virus en la población estudiada. No obstante destacamos la ocurrencia del virus en el período de menor índice pluviométrico de la estación.

Una de las muestras presentó coinfección con VRS. Efectivamente, en la literatura se describe un alto nivel de incidencia del HBoV asociado a otros virus, siendo frecuente su asociación al VRS^{2,8}.

Comparando las secuencias obtenidas a las existentes en el GenBank, se observó 100% de similitud con relación al gen NP1, y 98,6 a 99,3% cuando se refería a secuencias parciales de los genes VP1/VP2. Estos datos comprueban lo descrito referente a la alta conservación del gen NP1 y

refuerzan la baja mutabilidad genómica de los segmentos VP1/VP2^{16,25}.

CONCLUSIÓN

Los estudios muestran un bajo índice (0,76%) de HBoV en niños de 0 a 2 años de edad atendidas en ambulatorio en la capital de Pará, con existencia de coinfección con otros virus respiratorios.

Las cepas circulantes en el local estudiado se presentaron con pocas mutaciones, siendo que, cuando analizadas por su proteína no estructural, mostraron similitud total a las cepas denominadas ST1, en estudio realizado en Suecia.

Destacamos en este estudio las primeras detecciones de infecciones respiratorias asociadas al HBoV en la región de la Amazonía Legal.



Ocorrência de Bocavírus Humano associado às infecções respiratórias agudas em crianças de 0 a 2 anos de idade na Cidade de Belém, Pará, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: As Infecções Respiratórias Agudas (IRA) permanecem como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Essas infecções são associadas a diversos patógenos sendo os vírus os prevalentes. Recentemente, foi descrito na literatura um novo parvovírus denominado Bocavírus Humano (HBoV). Investigações ainda são escassas na associação deste novo agente a casos de IRA na população em geral. Neste contexto, o presente artigo relata a pesquisa do HBoV em um segmento populacional da Amazônia. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Neste estudo, foram analisadas amostras de aspirado nasofaríngeo de pacientes com diagnóstico de IRA atendidos ambulatorialmente na Cidade de Belém, Pará, Brasil. A pesquisa, com a identificação laboratorial do vírus, foi realizada mediante o emprego da técnica de reação em cadeia mediada pela polimerase, utilizando pares de oligonucleotídeos específicos, seguida da análise filogenética das sequências nucleotídicas encontradas. **RESULTADOS:** Das 397 amostras clínicas analisadas, encontrou-se positividade em amostras de três pacientes, sendo um destes em coinfeção com o vírus respiratório sincicial. **DISCUSSÃO:** O percentual de positividade obtido na investigação se revelou inferior ao descrito na literatura. Entretanto, vale ressaltar que os estudos já publicados envolveram pacientes hospitalizados, diferentemente do grupo populacional presentemente abordado. As análises filogenéticas realizadas evidenciaram expressiva similaridade dos vírus encontrados com as cepas virais já descritas. **CONCLUSÃO:** A presente pesquisa se caracteriza como o primeiro relato associando o HBoV à IRA na Região Amazônica.

Palavras-chave: Infecções Respiratórias; Bocavírus; Infecções por Parvoviridae.

Ocurrence of Human Bocavirus associated with acute respiratory infections in children up to 2 years old in the City of Belém, Pará State, Brazil

ABSTRACT

INTRODUCTION: Acute Respiratory Infections (ARI) are one of the main public health problems in the world. Most of these infections are associated with several pathogens, and viruses are the most prevalent agents. Recently, a new parvovirus named Human Bocavirus (HBoV) has been described. Investigations on the relationship between this new agent and cases of ARI in individuals are still scarce. Herein, we review a study of HBoV in a population segment in the Amazon. **MATERIALS AND METHODS:** In this study, samples of nasopharyngeal aspirates from patients with ARI treated in Health Care Units in Belém, Brazil, were analyzed. Identification of the virus was carried out by polymerase chain reaction using pairs of specific oligonucleotides, followed by phylogenetic analysis of the nucleotide sequences obtained. **RESULTS:** Of the 397 samples studied, three specimens were HBoV-positive, and one presented as a co-infection with the respiratory syncytial virus. **DISCUSSION:** The positivity rate obtained in this investigation was lower than that described in other studies; however, previous studies involved hospitalized patients, which constitute a different population group. The phylogenetic analyses revealed a significant similarity between the virus strains found and those previously described. **CONCLUSION:** This is the first report associating HBoV with ARI in the Amazon.

Keywords: Respiratory Tract Infections; Bocavirus; Parvoviridae Infections.

REFERENCIAS

- 1 Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr;44(7): 904-10.
- 2 Allander T, Tammi MT, 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 Sep; 102(36):12891-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15712.
- 3 Arruda E, Cintra AOL, Hayden FG. Respiratory tract viral infections. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. *Tropical infectious disease: principles, pathogens, and practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 637-59.
- 4 Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. [Internet]. 2009 Apr [citado 2009 jun 6];5(4):1-11. Disponible em: <http://www.plospathogens.org/article/info:doi/10.1371/journal.ppat.1000391>.
- 5 Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006 May;12(5):848-50.
- 6 Beckett CG, Kosasih H, Ma'roef C, Listiyaningsih E, Elyazar IR, Wuryadi S, et al. Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003. *Clin Infect Dis*. 2004 Aug; 39(4):443-9.
- 7 Chiesa AM, Westphal MF, Kashiwagi NM. Geoprocessing and health promotion: social and environmental inequalities, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2002 Oct;36(5):559-67.
- 8 Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, Rognlien AG, Døllner H. Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *J Clin Virol*. 2008 Jan;41(1):34-7.
- 9 Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1254-6.
- 10 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985 Jul; 39(4):783-91.
- 11 Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodière M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1251-3.
- 12 Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proença-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF, et al. Human bocavirus respiratory infections in children. *Epidemiol Infect*. 2009 Jul;137(7):1032-6.
- 13 Galiano M, Videla C, Puch SS, Martínez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol*. 2004 Feb;72(2): 299-303.
- 14 International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus index database [Internet]. 2009. [citado 2009 jul 5]. Disponible em: <http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/asp/iVirusIndex.asp>.
- 15 Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*. 2005 Jul; 79(13):8230-6.
- 16 Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamoan HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis*. 2006 Sep;12(9):1418-20.
- 17 Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009 Jan; 199(2):196-200.
- 18 Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Sep;8(3):240-8.
- 19 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20.
- 20 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 Mar;45(3):1032-4.
- 21 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004 Jun;5(2):150-63.
- 22 Lu X, Gooding LR, Erdman DD. Human bocavirus in tonsillar lymphocytes. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1332-4.
- 23 Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2006 Mar;44(3):1132-4.
- 24 Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol*. 2007 Nov;40(3):224-8.
- 25 Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2006 Sep; 12(9):1457-8.
- 26 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov;22(22):4673-80.

- 27 Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis.* 2006 Jul;6:109.
- 28 World Health Organization. The world health report 2005: make every mother and child count [Internet]. Geneva; 2005. [citado 2006 mai 15]. Disponível em: www.who.int/whr/2005/annex/annexes3-4_en.pdf.

Recebido em / Received / Recibido en: 30/7/2009
Aceito em / Accepted / Aceito en: 1/10/2009