

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

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

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)

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

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.

INTRODUÇÃO

As Infecções Respiratórias Agudas (IRA) permanecem como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, dada a sua alta morbimortalidade, principalmente em países em desenvolvimento^{7,28}. Estas infecções geralmente encontram-se associadas a diversos patógenos, tendo os vírus como prevalentes^{6,13}. Entre estes podemos citar os vírus Influenza A e B (Flu A e Flu B),

Parainfluenza 1, 2 e 3 (HPIV), Adenovírus (AdV), Vírus Respiratório Sincicial (VRS), Rinovírus (HRV), Coronavírus (HCoV) e o Metapneumovírus Humano (hMPV)^{3,18}.

Vários estudos continuam sendo conduzidos visando determinar a etiologia das infecções do trato respiratório, sendo que entre 12% a 39% dos casos nenhum agente conhecido é encontrado. Baseado nisso, Allander et al² descreveram o desenvolvimento de uma nova metodologia fundamentada em técnicas de biologia molecular, para investigação de possíveis novos agentes relacionados a infecções do trato respiratório, a partir da qual ele detectou um parvovírus previamente denominado Bocavírus Humano (HBoV), classificado taxonomicamente dentro do gênero *Bocavirus*, subfamília *Parvovirinae*, na família *Parvoviridae*^{2,14}.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

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

O HBoV é um vírus não envelopado, de simetria icosaédrica, medindo de 18 a 26 nanômetros de diâmetro, com cápside formada por cerca de 60 capsômeros. O genoma viral apresenta-se não segmentado, composto por ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita simples, sentido positivo e negativo com aproximadamente 5.3 Kb. Possui três matrizes de leitura (ORFs) codificando quatro proteínas: VP1 e VP2 proteínas estruturais do vírion; NS1, proteína não-estrutural; e a nucleoproteína NP1, com função desconhecida.

Estudos têm demonstrado que o HBoV aparentemente possui uma distribuição mundial^{5,9,11,16,23,25,27}, com frequência que varia de 1,5%⁵ a 19%¹. Poucos estudos foram conduzidos na América Latina quanto à associação do HBoV a outras infecções respiratórias. Merece destaque o alto percentual (5 - 85%) em que este vírus é encontrado como coinfeção, tanto com vírus, como com outros patógenos^{12,25,27}.

A transmissão do HBoV mostra-se indefinida, devido a ter sido achado, diversas vezes, no trato respiratório^{5,9,23,27}, soro¹⁵, sangue^{1,17}, urina²⁴ e em gastroenterites^{4,24}; porém estudos mostram o HBoV como o quarto agente mais frequentemente detectado em pacientes de até 2 anos de idade, hospitalizados com quadro de infecção do trato respiratório inferior^{1,24}, sugerindo que a via aérea é a principal via de transmissão.

A sintomatologia observada nos casos de infecção por HBoV inclui a de um resfriado comum, com febre e rinorréia, e também sibilos e dispnéia. Na ocorrência de agravos, geralmente registra-se o desenvolvimento de bronquite, bronquiolite e pneumonia^{11,20,23}. Estudos sugerem que o HBoV pode estabelecer infecções latentes ou persistentes de linfócitos da mucosa, ou contribuir para hiperplasia tonsilar²².

O perfil sazonal dos casos de infecção pelo HBoV ainda não está bem estabelecido. Contudo, em países de clima temperado a ocorrência deste vírus é mais acentuada no inverno e início da primavera^{11,27}.

Até o momento, estudos mostram a existência de três tipos de HBoV (HBoV1, HBoV2 e HBoV3) sendo que o tipo 3 só foi encontrado em fezes⁴ e o tipo 2 encontrado em sangue e fezes^{4,17}. Associado à IRA, mostra-se somente o HBoV1.

Quanto à variabilidade genética, Allander et al² descreveram duas linhagens (ST1 e ST2) muito conservadas. Este vírus parece ser bem estável, com poucas mutações sendo demonstradas nas sequências dos genes VP1 e VP2. As divergências observadas nas sequências nucleotídicas são causadas por mutações pontuais, resultantes em poucas trocas na cadeia aminoácídica^{16,25}.

Nos países de clima tropical, assim como o Brasil, poucas investigações sobre a ocorrência de HBoV, bem como sua variabilidade genética, vêm sendo conduzidas. Neste contexto, reforça-se a necessidade da realização de estudos que possibilitem gerar dados epidemiológicos sobre este agente, para melhor definir o papel do HBoV nos casos de IRA na Amazônia.

MATERIAIS E MÉTODOS

POPULAÇÃO ESTUDADA

Entre os anos de 2004 a 2007, amostras de swab combinado (narina/garganta) e aspirado nasofaríngeo foram coletadas ambulatorialmente pelo Sistema de Vigilância Viroológica da Rede de Influenza, do Laboratório de Vírus Respiratórios (LVR) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Uma triagem selecionou crianças com até 2 anos de idade, apresentando sinais e sintomas de IRA com até cinco dias de evolução.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas foram centrifugadas a 1.000 rpm durante 10'. Com os sedimentos do centrifugado, foram preparadas lâminas seguindo orientação do kit comercial *Light Diagnostics™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA* para Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizadas para a pesquisa do vírus Influenza A e B, Parainfluenza 1-3, Adenovírus e VRS. O sobrenadante foi utilizado para tentativa de isolamento do HBoV por técnicas de biologia molecular.

IDENTIFICAÇÃO POR BIOLOGIA MOLECULAR

Para a extração, padronizou-se um protocolo pelo qual, inicialmente, colocou-se em um microtubo 150 µL de tampão TNE (Tris-Na-EDTA), 20 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) somado a 120 µL de amostra. Incubou-se à temperatura de 56° C por 30' em termobloco (Eppendorf). Posteriormente, acrescentou-se 200 µL de fenol saturado, seguido por agitação durante 1' em vortex e centrifugação a 10.000 rpm a 20° C por 3'. Transferiu-se 150 µL do sobrenadante para um microtubo contendo 150 µL de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico. Novamente a mistura passou por agitação em vortex por 1' e centrifugação a 10.000 rpm a 20° C por 3'. Transferiu-se 100 µL do sobrenadante para um microtubo contendo 100 µL de clorofórmio, agitou-se em vortex por 1' e centrifugou-se por 10.000 rpm a 20° C por 3'. Por fim, retirou-se cuidadosamente 40 µL do sobrenadante, sendo o extraído conservado a temperatura de -20° C.

A reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) deu-se utilizando pares de oligonucleotídeos específicos BoV 118F, BoV 542R (NP1); VP+/+1, VP-/726 (VP1) e VP+/1005, VP-/2072 (VP2), conforme iniciadores e tamanhos de amplicons, encontram-se no quadro 1.

Oligonucleotídeo	Sequência	Tamanho do amplicon
BoV 118F	5'GAGCTCTGTAAGTACTATTAC3'	354pb
BoV 542R	5'CTCTGTGTGACTGAATACAG 3'	
VP+/+1	5'GCTGCTGAAAGCATGGAAGCA3'	725pb
VP-/726	5'GGCGCTGCCAATCCTGTGGT3'	
VP+/1005	5'GCTGGAGGCAATGCTACAGAA3'	1067pb
VP-/2072	5'TCCGCTTGCTCCATTGAGGAGG3'	

Quadro 1 – Descrição dos iniciadores

Para todos os genes, usou-se reação com volume final de 50 µL contendo: 5 µL do DNA extraído, 0,5 µL de cada iniciador (50 pmol/µL), 5 µL de tampão de reação (10x), 2 µL de dNTP (5 mM), 5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,25 U de Taq DNA polimerase e 31,5 µL de água livre de DNase/RNase. O programa adotado foi o especificado por Allander et al².

Amostras de PCR positivas para HBoV foram testadas para o gene VP1/VP2 sendo preparadas para o sequenciamento parcial com o Kit Big Dye® terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem) seguindo instruções do fabricante, e sequenciado utilizando o sequenciador automático ABIPrism 3130xl (Applied Biosystem).

Todas as reações foram realizadas em termociclador automático Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf) sempre com controles negativos e positivos, a fim de evitar contaminação com DNA exógeno.

ANÁLISE E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

As sequências nucleotídicas obtidas do HBoV foram analisadas e editadas utilizando-se o programa BioEdit v 7.0, e comparadas com sequências de outros vírus isolados e disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os programas Clustal W v 1.7²⁶ e Mega v 3.1²¹. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o método neighbor joining (NJ), implementado no programa Mega v 3.1. A matriz de distância no método de NJ foi calculada a partir das sequências alinhadas usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura¹⁹. A análise de bootstrap usando 2 mil réplicas foi utilizada para gerar maior confiabilidade aos valores dos agrupamentos¹⁰.

RESULTADOS

Foram analisadas 397 amostras, obtendo-se positividade comprovada por sequenciamento para infecção por HBoV em três delas (0,76%).

Em todos os casos positivos observou-se a infecção no período não chuvoso, acometendo crianças do sexo masculino, com idade de 29 semanas, em média, e em todos os casos apresentando coriza e tosse. Um caso mostrou coinfeção HBoV/VRS; a criança apresentava ainda febre e congestão nasal (Quadro 2).

Paciente	Data da colheita da amostra	Idade	Sexo	Sintomas	Coinfeção
099-04	12/8/2004	9 meses	Masculino	Coriza, tosse	Não
934-07	14/8/2007	6 meses	Masculino	Coriza, tosse febre e obstrução	VRS
619-07	25/10/2007	8 meses	Masculino	Coriza, tosse	Não

Quadro 2 – Dados dos pacientes com infecção pelo HBoV

Quanto à análise filogenética, o segmento NP1 mostrou-se com 100% de similaridade quando comparada as cepas descritas por Allander et al². A quando da análise das sequências do gene VP1/VP2, uma amostra foi sequenciada e observou-se similaridade de 98,3% a 99,7%, comparadas às sequências de cepas disponíveis no GenBank (Figura 1).

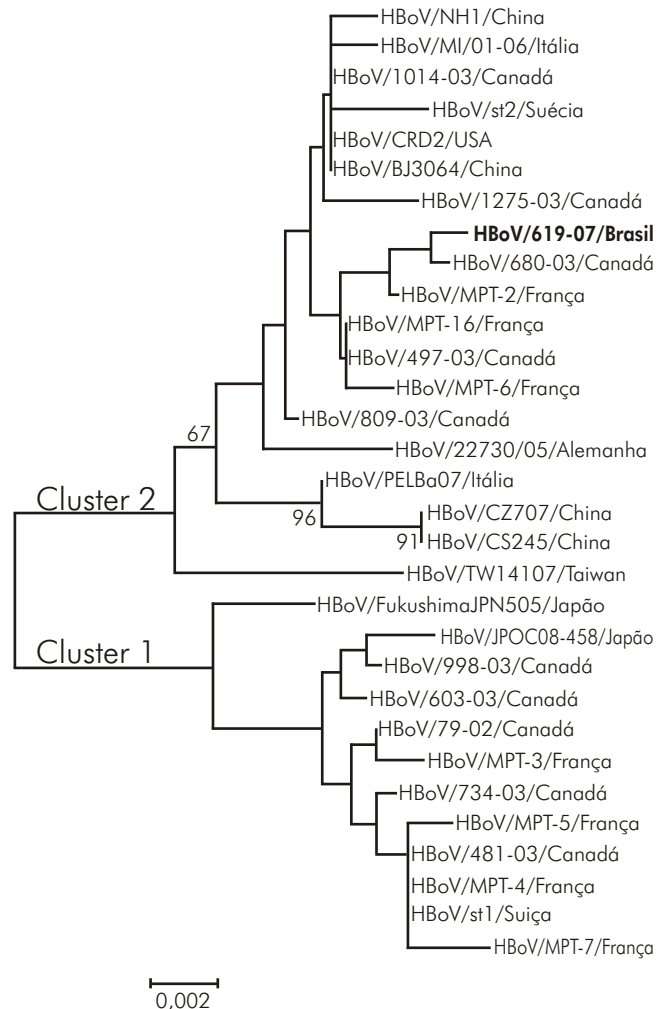


Figura 1 – Análise filogenética da sequência parcial do gene codificador das proteínas de superfície VP1/VP2 de HBoV. A árvore foi gerada pelo método de NJ utilizando o programa Mega v 3.1. Valores de bootstrap (X 2000) foram dados para os nós selecionados

DISCUSSÃO

Entre janeiro de 2004 e dezembro de 2007, foram diagnosticados três casos de infecção respiratória aguda (0,76%) associados ao Bocavírus Humano, entre 397 amostras locais, na Cidade de Belém, Pará. Duas amostras foram detectadas no ano de 2004 e a outra em 2007.

Estes dados revelam um baixo percentual de positividade para HBoV, quando comparado com dados disponíveis na literatura, os quais referem frequência de detecção em até 19% dos casos investigados¹. Vale ressaltar, contudo, que as amostras envolvidas neste estudo são oriundas de pacientes atendidos ambulatorialmente, diferentemente dos estudos em que foram encontradas as maiores taxas de associação, uma vez que estes englobavam pacientes hospitalizados^{9,27}.

A baixa positividade encontrada não permitiu inferir padrões epidemiológicos de prevalência e sazonalidade ocasionados pelo vírus na população estudada. Entretanto destacamos a ocorrência do vírus no período de menor índice pluviométrico sazonal.

Uma das amostras apresentou coinfeção com VRS. De fato, na literatura descreve-se uma alta incidência do HBoV associado com outros vírus, sendo frequente sua associação com o VRS^{2,8}.

Comparando as sequências obtidas com as existentes no GenBank, observou-se 100% de similaridade quanto ao gene NP1, e 98,6% a 99,3% quando se referia a sequências parciais dos genes VP1/VP2. Estes dados comprovam o descrito quanto à alta conservação do gene Np1 e reforçam a baixa mutabilidade genômica dos segmentos VP1/VP2^{16,25}.

CONCLUSÃO

Os estudos mostram um baixo índice (0,76%) de HBoV em crianças de 0 a 2 anos de idade atendidas ambulatorialmente na capital do Pará, com existência de coinfeção com outros vírus respiratórios.

As cepas circulantes no local estudado mostraram-se com poucas mutações, sendo que, quando analisadas pela sua proteína não-estrutural, mostraram-se com similaridade total à linhagem denominada ST1, em estudo realizado na Suécia.

Ressaltamos neste estudo as primeiras detecções de infecções respiratórias associadas ao HBoV na região da Amazônia Legal.



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.

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)

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.



REFERÊNCIAS

- 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. Disponível 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]. Disponível 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, Shamooh 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, Shaukat 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: http://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