

Človeški bokavirus (HBoV) – novi parvovirus

Human bocavirus (HBoV) – new parvovirus

Tina Uršič, Miroslav Petrovec

Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo,
Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani,
Zaloška 4,
1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Tina Uršič, Inštitut za
mikrobiologijo, Zaloška 4,
1000 Ljubljana
Tel.: 01-5437-458

Ključne besede:

človeški bokavirus, HBoV,
okužbe dihal, okužbe
prebavil, virusno breme

Key words:

human bocavirus, HBoV,
respiratory infections,
gastrointestinal
infections, viral load

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81: 320–5

Prispelo: 19. avg. 2011,
Sprejeto: 30. nov. 2011

Izvleček

Človeški bokavirus so odkrili leta 2005 v izpirkih nosnega dela žrela pri švedskih otrocih z akutno okužbo dihal. Virus je prisoten povsod po svetu. Prisoten je pri otrocih z okužbo dihal, pri otrocih z gastroenteritisom, pri imunsko oslabljenih osebah in pri zdravih osebah brez simptomov. Virusno DNA so dokazali v vzorcih dihal, v krvi, v iztrebkih in v urinu. V prispevku sta podrobneje opisani biologija in epidemiologija virusa, klinična slika okužbe s človeškim bokavirusom ter laboratorijska diagnostika. Patogeneza in klinični pomen človeškega bokavirusa še nista v celoti pojasnjena.

Abstract

Human bocavirus was discovered in 2005 in nasopharyngeal aspirates of Swedish children with acute respiratory tract infection (ARTI). The virus is distributed worldwide. HBoV is detected in children with respiratory tract infection in children with acute gastroenteritis, it has also been reported in immunocompromised patients and in asymptomatic control groups. HBoV DNA was detected in respiratory samples as well as in stool samples, blood and urine. This article reports on HBoV, including biology and taxonomy, epidemiology, clinical presentations and laboratory diagnostics of HBoV. The pathogenesis and clinical significance of human bocavirus have not been fully explained yet.

Uvod

Od odkritja človeški bokavirus (HBoV) povezujejo z okužbami zgornjih in spodnjih dihal ter okužbo prebavil pri otrocih po vsem svetu. Nedavno so bili pri otrocih z gastroenteritisom odkriti trije novi človeški bokavirusi, ki so najbolj sorodni HBoV in so jih poimenovali HBoV₂, HBoV₃ ter HBoV₄.¹⁻³ V nadaljevanju prispevka se osredinjamo na človeški bokavirus (HBoV oz. HBoV₁), ki povzroča okužbe dihal in prebavil.

Taksonomija, biologija in patogeneza

HBoV so odkrili leta 2005 na Švedskem v izpirkih nosnega dela žrela pri otrocih z akutno okužbo dihal. Na podlagi filogenetske analize so novi parvovirus uvrstili v družino *Parvoviridae*, poddružino *Parvovirinae* in rod *Bocavirus*.⁴ Filogenetska analiza

je pokazala, da je novi parvovirus soroden govejemu parvovirusu (*bovine parvovirus 1* oz. BPV 1) in pasjemu parvovirusu (*canine minute viruse* oz. MVC), po katerih je novo odkriti virus dobil ime »bocavirus« oz. človeški bokavirus (HBoV oz. HBoV 1).^{5,6}

Genom HBoV je enovijačna deoksiribonukleinska kislina (DNA) dolga približno 5,3 kbp. Trije odprti bralni okvirji (angl. *Open Reading Frame* – ORF) kodirajo dve nestrukturni beljakovini NS₁ in NP₁ in dve strukturalni beljakovini VP₁ in VP₂. Virusi so ikozaedrične oblike, veliki med 18 in 25 nm in nimajo ovojnice.^{7,8} Znana sta dva genotipa HBoV, ST₁ in ST₂, ki se v celotnem genomu med seboj razlikujeta v samo 26 nukleotidih.⁹

O patogenezi HBoV je malo znanega. Parvovirusi na splošno povzročajo sistemske okužbe. Ker za svoje razmnoževanje potrebujejo deleče se gostiteljske celice, so njihova tarčna mesta okužb sluznice dihal in

prebavil, eritroidne progenitorske celice in zarodne celice.¹⁰ Znano je, da nekateri virusi iz družine *Parvoviridae* (*Parvovirus B19* in *PARV4*) lahko povzročajo okužbe, pri katerih virusna DNA lahko ostane v nizkih koncentracijah v krvi prisotna vse življenje.¹¹ Raziskave so pokazale, da je HBoV DNA v vzorcih dihal in v plazmi lahko prisotna več mesecev po okužbi.¹²⁻¹⁴

Nizozemski raziskovalci so avgusta 2009 osamili HBoV na celični kulturi človeškega dihalnega epitela.¹⁵ Istega leta je kitajski raziskovalni skupini uspelo osamiti HBoV na celični kulturi človeških bronhialnih celic.¹⁶ Zaenkrat ni ustrezenega *in vivo* sistema (poskusne živali) za razmnoževanje HBoV, zato sta mehanizem vstopa človeškega bokavirusa v celico in replikacija virusa dokaj neznana.¹⁷

Epidemiologija človeškega bokavirusa

Raziskovalci poročajo o okužbah, ki jih povzroča HBoV. Prisotnost HBoV so potrdili v Evropi, v Afriki, Avstraliji, na Novi Zelandiji, v Aziji ter severni in južni Ameriki.^{4,9,18-22} Večina raziskav o pogostnosti okužbe s HBoV temelji na dokazu HBoV DNA v vzorcih dihal, predvsem otrok z akutno okužbo dihal.^{4,8,18-20,23-26} Vse več je tudi raziskav, ki potrjujejo prisotnost HBoV DNA v vzorcih krvi in iztrebkov otrok z gastroenteritisom.²⁷⁻³¹ Prisotnost HBoV DNA so potrdili tudi pri imunsko oslabljenih osebah.^{29,32-34}

Glede na dostopne podatke je razvidno, da je HBoV endemičen virus z visoko pogostnostjo okužbe pri otrocih do drugega leta starosti.^{13,35,36} HBoV povzroča sezonske oblike okužb s povečano pogostnostjo v pozni jeseni, pozimi in spomladi.^{37,38} Posamezne objavljene raziskave so prospektivne.^{23,39-44} V vseh ostalih so bili rezultati laboratorijskih testov in klinični podatki pridobljeni retrospektivno. Rezultati kažejo, da je največja pogostnost okužbe s HBoV pri otrocih med prvim in drugim letom starosti.^{13,35,36} V raziskavah so dokazali nizko pogostnost okužbe s HBoV pri otrocih, mlajših od šest mesecev, kar se ujema z rezultati seroepidemioloških raziskav, ki ka-

žejo, da novorojenčke in otroke do šestega meseca starosti pred okužbo s HBoV ščitijo materina zaščitna protitelesa.⁴⁵

HBoV v 18 % do 83 % dokažemo sočasno z drugimi virusnimi povzročitelji okužb.¹⁷ Kljub številnim dokazom o patogenosti HBoV še vedno obstaja dvom o etiološkem pomenu HBoV kot povzročitelju bolezni. Še vedno ni jasno, ali koinfekcije z različnimi virusi potekajo drugače in/ali huje kot monoinfekcija. Znano je, da je HBoV DNA v vzorcih dihal prisotna dalj časa po okužbi kot nukleinske kisline drugih virusov. Posledica so pozitivni vzorci z nizkim virusnim bremenom HBoV, ki lahko pomenijo akutno, preteklo, vztrajajočo ali okužbo brez simptomov.^{13,14,23,46}

Prenos

Najverjetnejše poti prenosa HBoV so kapljično, z rokami, z rok na površine, možen je fekalno-oralni prenos, znane pa so tudi bolnišnične okužbe.^{8,17,25,47,48} Vse več je raziskav, v katerih opisujejo bolnišnične okužbe s HBoV, predvsem na oddelkih za intenzivno zdravljenje. Okužbe so lahko hude in potek bolezni je težak predvsem pri nedonošenčkih in otrocih z drugimi osnovnimi pljučnimi boleznimi.^{25,36,47,48}

Klinična slika pri okužbi dihal

HBoV je pogosto prisoten pri otrocih z akutno okužbo zgornjih dihal, vnetjem srednjega ušesa ter pri otrocih s pljučnico, bronhiolitisom in bronhitisom.^{37,38,49,50} HBoV pogosto dokažemo tudi pri otrocih s ponavljajočim se piskanjem²³ in pri otrocih, pri katerih pride do akutnega poslabšanja astme kot osnovne bolezni.^{17,51} Pri okužbi s HBoV največkrat opisujejo prisotnost kašlja, hipoksije, težkega dihanja (dispneja), povišane telesne temperature, piskanja in rinoreje, redkeje pa so prisotni konjunktivitis, bruhanje in driska. Klinična slika okužbe dihal, ki jih povzroča HBoV, je podobna tisti, ki jo povzročajo drugi virusi. Na osnovi simptomov in kliničnih znakov je zato nemogoče določiti povzročitelja okužbe.

Po podatkih iz literature je pogostnost okužbe s HBoV v Sloveniji 18,4 %. HBoV

se po pogostnosti okužb dihal uvršča na tretje mesto, takoj za človeškimi rinovirusi (hRV) in respiratornim sincicijskim virusom (RSV).⁵² Srednja starost otrok, okuženih s HBoV, je 17 mesecev. Dečki so pogosteje okuženi kot deklice. Otroci med prvim in drugim letom starosti so pogosteje okuženi s HBoV kot otroci iz drugih starostnih skupin. Srednje trajanje bolnišničnega zdravljenja otrok, okuženih s HBoV, je 4,5 dni, srednje zdravljenje s kisikom pa 2 dni. Pogosto opisani simptomi in znaki so kašelj, dispneja, hipoksija, rinoreja in piskanje, redki pa so povišana telesna temperatura, bruhanje, driska in konjunktivitis. Kar 97 % otrok, okuženih s HBoV kot edinim povzročiteljem okužbe dihal, ima okužbo spodnjih dihal in najpogostejša diagnoza je bronhilitis (59,1 %). Otroci, ki so okuženi samo s HBoV, imajo značilno višje virusno breme, kot otroci, pri katerih so poleg HBoV prisotni drugi virusi. Nedonošeni otroci in otroci, stari med prvim in drugim letom, imajo značilno višje srednje virusno breme kot otroci, rojeni ob predvidenemu roku poroda ali otroci iz drugih starostnih skupin.⁵²

V Sloveniji je prvič opisan tudi primer otroka, pri katerem je človeški bokavirus povzročil življenje ogrožajočo okužbo spodnjih dihal s pnevmotoraksom, pnevmodiastinumom in akutno dihalno odpovedjo.⁵³

Okužbe prebavil

HBoV so našli v iztrebkih otrok, ki so potrebovali bolnišnično zdravljenje zaradi akutnega gastroenteritisa. Prav tako so HBoV DNA našli v iztrebkih otrok z okužbo dihal in spremljajočo drisko, pri otrocih brez simptomov, pri odraslih in pri imunsko oslabeledih osebah z diseminirano HBoV okužbo.^{1,30,31,54-56}

Podatki o pogostnosti okužbe prebavil, ki jo povzroča HBoV, prihajajo iz vse več držav in je med 0,8 % in 9,1 %.^{30,31} Pri otrocih z okužbo dihal, ki jo povzroča HBoV, poročajo o spremljajočih driskah in dokazu DNA HBoV v iztrebkih otrok z akutno okužbo dihal. Poleg tega so pri otrocih, ki imajo v iztrebkih prisotno DNA HBoV, dokazali statistično značilno višje srednje virusno bre-

me HBoV v izpirku iz nosnega dela žrela, v primerjavi z otroki, ki v iztrebkih niso imeli prisotne DNA HBoV.⁵⁶ HBoV pogosto dokažejo v iztrebkih, vendar njegova vloga pri okužbi prebavil še ni pojasnjena. Pogosto je prisoten z drugimi virusi, ki so znani povzročitelji gastroenteritsov.

Okužbe pri odraslih in imunsko oslabeledih osebah

Pogostost in potencialna patogenost HBoV pri imunsko oslabeledih osebah nista znani. Visoka pogostost in visok odstotek sočasnih okužb pri otrocih kažeta na virusno vztrajanje (perzistenco), vendar pa HBoV le redko dokažejo pri odraslih osebah. Večina raziskav pri odraslih je bila narejena pri imunsko oslabeledih osebah. Opisana je okužba s HBoV pri osebi z okužbo s HIV,³² osebi z ne-Hodgkinovim limfomom,⁵⁷ in pri otroku z levkemijo.³⁴ Opisana je diseminirana okužba s HBoV pri imunsko oslabeledemu otroku po presaditvi kostnega mozga,²⁹ pri katerem so visoko virusno breme s HBoV potrdili v izpirku nosnega žrela, v iztrebkih in v plazmi. HBoV DNA so dokazali tudi pri otroku po presaditvi jeter, ki je preboleval drisko, in s hipovolemičnim šokom.³³ Dokaz HBoV pri imunsko oslabeledih osebah lahko pomeni akutno okužbo, ponovno okužbo (reinfekcijo), vztrajanje virusa ali pa njegovo reaktivacijo.⁸ To je pomembno področje za nadaljnje raziskave, ki bi potrdile ali ovrgle perzistenco človeškega bokavirusa.¹⁴

Laboratorijska diagnostika

HBoV lahko dokažemo v vzorcih dihal, v krvi, v iztrebkih in v urinu. V laboratorijski diagnostiki sta najbolj razširjeni metodi verižna reakcija s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času, ki je bodisi kvalitativna ali kvantitativna. Vse bolj je v uporabi različica kvantitativnega PCR v realnem času, s katerimi lahko v vzorcu določamo virusno breme HBoV in je bolj občutljiva v primerjavi s klasičnim PCR.^{8,17,46}

V seroepidemioloških raziskavah so z različnimi encimsko imunskimi metode (EIA oz. ELISA), metode posredne imunofluore-

scence, metode Western Blot ter s pomočjo virusnih delcev (VLP; *virus like particles*), v serumih bolnikov z akutno HBoV okužbo dokazali prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgM proti HBoV.^{45,58-61} Trenutno ni na voljo komercialnih kompletov reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG in IgM proti HBoV. Uporaba teh metod je omejena samo na posamezne laboratorije. Razvoj teh metod bo v prihodnosti nujen, da bomo lažje ločili akutno okužbo od perzistentne. Pomen dokaza DNA HBoV v plazmi ali v nosnem delu žrela dolgo po okužbi ni znan.¹⁴

Zdravljenje

Pri otrocih brez osnovnih boleznih okužba s HBoV poteka običajno brez zapletov in mine sama od sebe. Protivirusnih zdravil proti HBoV še ni.¹⁷ Zdravljenje bolnikov z okužbo dihal je podporno. V prihodnosti so med možnimi terapevtskimi strategijami razvoj cepiva in/ali zaščita z nevtralizirajočimi protitelesi.¹⁷

Zaključki

Kochovi postulati, s katerimi bi lahko vzročno povezali HBoV in bolezen, niso v celoti izpolnjeni. Šele nedavno je raziskovalcem uspelo osamiti HBoV na celični kulturi človeškega dihalnega epitela in človeški bronhialni celični liniji. Za virus ni živalskega modela, ki bi omogočal *in vivo* razmnoževanje virusa. Kljub temu pa številne raziskave kažejo, da HBoV izpolnjuje večino alternativnih vzročnih meril med dokazom virusa in boleznijo, ki sta jih za mikrobe, ki jih dokazujemo z molekularnimi metodami, predlagala Fredricks in Relman.⁶²

Rezultati seroepidemioloških raziskav kažejo, da HBoV izpolnjuje tudi elemente za imunološki dokaz vzročnosti, ki jih je predlagal Alfred Evans.⁶³

HBoV je eden od najpogosteje dokazanih virusov v vzorcih dihal pri otrocih z

akutno okužbo dihal, ki mu pripisujejo vse večji klinični pomen.

Literatura

1. 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; 199: 196–200.
2. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS pathogens* 2009; 5: e1000391.
3. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis* 2010; 201: 1633–43.
4. 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; 102: 12891–6.
5. Durham PJ, Lax A, Johnson RH. Pathological and virological studies of experimental parvoviral enteritis in calves. *Res Vet Sci* 1985; 38: 209–19.
6. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 165–74.
7. Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol* 2006; 80: 5941–50.
8. Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 291–304.
9. Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1457–8.
10. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 485–505.
11. Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J Infect Dis* 2007; 195: 1345–52.
12. Soderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* 1997; 349: 1063–5.
13. von Linstow ML, Hogh M, Hogh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 897–902.
14. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis* 2010; 201: 1625–32.
15. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be

- cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol* 2009; 83: 7739–48.
16. Lin F, Teng LF, Zheng MY, Zheng CH, Wu F, Li H, et al. [Isolation and cell culture of human bocavirus (HBoV) by human bronchial epithelial cell lines]. *Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he lincuang bingdouxue zazhi = Chin J Experiment Clin Virol* 2009; 23: 437–9.
 17. Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med* 2009; 29: 695–713.
 18. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 283–8.
 19. Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamoan HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1418–20.
 20. Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, Dove W, Hart CA. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. *J Med Virol* 2007; 79: 539–43.
 21. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhao AG, Ramirez ML, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1756–8.
 22. Redshaw N, Wood C, Rich F, Grimwood K, Kirman JR. Human bocavirus in infants, New Zealand. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1797–9.
 23. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 904–10.
 24. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 1; 43(5): 585–92.
 25. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006; 194: 1276–82.
 26. Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, et al. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 610–3.
 27. Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol* 2007; 38: 321–5.
 28. Tozer SJ, Lambert SB, Whiley DM, Bialasiewicz S, Lyon MJ, Nissen MD, et al. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR. *J Med Virol* 2009; 81: 488–93.
 29. Schenk T, Strahm B, Kontny U, Hufnagel M, Neumann-Haefelin D, Falcone V. Disseminated bocavirus infection after stem cell transplant. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1425–7.
 30. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007; 196: 994–7.
 31. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 636–7.
 32. Kainulainen L, Waris M, Soderlund-Venermo M, Allander T, Hedman K, Ruuskanen O. Hepatitis and human bocavirus primary infection in a child with T-cell deficiency. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4104–5.
 33. de Vries JJ, Bredius RG, van Rheenen PF, Smiers FJ, Scholvinck EH, Vossen AC, et al. Human bocavirus in an immunocompromised child presenting with severe diarrhea. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1241–3.
 34. Koskenvuo M, Mottonen M, Waris M, Allander T, Salmi TT, Ruuskanen O. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 1011–5.
 35. 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; 6: 109.
 36. Chow BD, Huang YT, Esper FP. Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio. *J Clin Virol* 2008; 43: 302–6.
 37. Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1251–3.
 38. Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007; 40: 224–8.
 39. Regamey N, Frey U, Deffernez C, Latzin P, Kaiser L. Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory infections. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 177–9.
 40. Monteny M, Niesters HG, Moll HA, Berger MY. Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 180–2.
 41. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007; 195: 1038–45.
 42. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Broor S. Human bocavirus infection in children with acute respiratory tract infection in India. *J Med Virol* 2010; 82: 812–6.
 43. Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: e7–e10.
 44. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child* 2010; 95: 35–41.
 45. Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirakoshi R, Ma X, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3218–23.
 46. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008; 41: 29–33.
 47. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Santos MJ, Pozo F, Perez-Brena P, et al. Human bocavirus infection in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis* 2008; 57: 269–71.

48. Durigon GS, Oliveira DB, Vollet SB, Storni JG, Felicio MC, Finelli C, et al. Hospital-acquired human bocavirus in infants. *J Hosp Infect* 2010; 76: 171–3.
49. Brieu N, Guyon G, Rodiere M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 969–73.
50. I PM, Nelson EA, Cheuk ES, Leung E, Sung R, Chan PK. Pediatric hospitalization of acute respiratory tract infections with Human Bocavirus in Hong Kong. *J Clin Virol* 2008; 42: 72–4.
51. Vallet C, Pons-Catalano C, Mandelcwaig A, Wang A, Raymond J, Lebon P, et al. Human bocavirus: a cause of severe asthma exacerbation in children. *J Pediatr* 2009; 155: 286–8.
52. Ursic T, Jevsnik M, Zigon N, Krivec U, Borinc Benden A, Praprotnik M, Petrovec M. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a two-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol* 2012; 84: 99–108.
53. Ursic T, Steyer A, Kopriva S, Kalan G, Krivec U, Petrovec M. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1179–81.
54. Schildgen O, Muller A, Simon A. Human bocavirus and gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1620–1.
55. Cheng WX, Jin Y, Duan ZJ, Xu ZQ, Qi HM, Zhang Q, et al. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 161–7.
56. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Reithwilm A, Kreth HW, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2116–22.
57. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1614–6.
58. Lindner J, Karalar L, Zehentmeier S, Plentz A, Pfister H, Struff W, et al. Humoral immune response against human bocavirus VP2 virus-like particles. *Viral Immunol* 2008; 21: 443–9.
59. Kantola K, Hedman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 540–6.
60. Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, D'Abramo A, Jr., Cosby C, Weibel C, et al. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Dis* 2008; 198: 41–50.
61. Don M, Soderlund-Venermo M, Valent F, Lahtinen A, Hedman L, Canciani M, et al. Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 120–6.
62. Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 18–33.
63. Evans AS. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med* 1976; 49: 175–95.