

Çocukluk Çağı Akut Solunum Yolları Enfeksiyonlarında Bocavirüs Saptanması

Bocavirus Detection in Acute Respiratory Tract Infections of Childhood

Sevinç Yenice Aktaş¹, Fikret Şahin², Deniz Tekin², Devran Gerçeker²

¹Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Solunum yolu enfeksiyonu şikayetleri ile hastaneye başvuran 2 yaş altı çocuklarda insan bocavirüsün (HBoV) sıklığının moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mart - Kasım 2009 tarihleri arasında çocuk hastalıkları polikliniği ve çocuk acil polikliniğine solunum yolu enfeksiyonu şikayetleriyle başvuran 2 yaş altındaki çocuklardan alınan nazofarengeal aspirat örnekleri -80 °C'de saklandıktan sonra Mart - Haziran 2010 tarihlerinde çalışmaya alındı. HBoV DNA'sı, primer dizaynı sonrasında "in house" polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak incelendi. Çalışma sırasında yeni tanımlanan bir virüs olduğundan pozitif kontrol ile çalışılmamış olup, pozitif olduğu düşünülen örnekler sekans analizi ile tanımlandı. Görüldüğü gibi, bu çalışma Türkiye'de 2 yaş altı çocuklarda yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamız retrospektif, tanımlayıcı bir çalışmadır. Hastalara ait demografik veriler (yüzdeler, ortalama, minimum-maksimum değerleri) SPSS paket programıyla analiz edildi.

Bulgular: HBoV saptanması amacı ile 200 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastaların yaş ortalaması 7,4 (minimum: 30 gün, maksimum: 24 ay) aydı ve %64'ü erkek çocuktü. Bu hastalardan alınan 200 nazofarengeal aspirat örneği incelendi. Nazofarengeal örneklerden 6'sında (%3) HBoV DNA'sı pozitif bulundu. Pozitif çıkan 6 örneğin 5 tanesi erkek, 1 tanesi kız hastalara aitti ve yaşları 4-24 ay aralığındaydı.

Sonuç: Solunum yolu enfeksiyonu şikayetiyle başvuran 2 yaş altındaki çocuklarda PZR yöntemi ile %3 oranında HBoV DNA pozitifliği saptandı. HBoV'nin patojenitesi ile ilgili kanıtlar artmakla birlikte, HBoV'nin hastalıklarla ilişkisi ve şiddetiyle ilgili bilgilerin artması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: İnsan Bocavirüs, Solunum Virüsleri, Çocukluk Çağı Enfeksiyonları

Abstract

Objectives: To investigate the frequency of human bocavirus (HBoV) in children under the age of 2 years, who applied to the hospital with respiratory tract infection complaints, by using molecular methods.

Materials and Methods: In November 2009, nasopharyngeal aspirate samples were collected from children under the age of 2 years, who applied to the pediatric outpatient clinic and pediatric emergency outpatient clinics with the complaints of respiratory tract infections, and aspirate samples were included in the study between March and June 2010 after being stored at -80 °C. HBoV DNA was analyzed using the "in house" polymerase chain reaction (PCR) method after primer design. At that time, since it was a newly identified virus, it could not be studied with the positive control, and the samples thought to be positive were identified by sequence analysis. As can be seen, the study is the first study conducted in Turkey with children under the age of 2 years. The study is a retrospective descriptive study. Demographic data of the patients (percentages, mean, minimum-maximum values) were analyzed with the SPSS package program.

Results: For the purpose of detecting HBoV, 200 patients were included in the study. The mean age of these patients was 7.4 (minimum: 30 days, maximum: 24 months) months, and 64% were boys. Two-hundred nasopharyngeal aspirate samples taken from these patients were analyzed. HBoV DNA was positive in 6 (3%) of the nasopharyngeal samples. Of the 6 positive samples, 5 belonged to male and 1 belonged to female gender and

*ATFM-04935 no'lu makalemiz 2019 yılında yazmış olduğumuz tezimizden alıntı yapılarak oluşturulmuştur. Hiçbir yerde sunumu ve yayını yapılmamıştır.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Sevinç Yenice Aktaş,

Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 532 211 42 33 E-posta: sevincyenice@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-0877-9162

Geliş Tarihi/Received: 11.06.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 01.07.2021

©Telif Hakkı 2021 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



their ages were between 4 and 24 months.

Abstract

Conclusion: HBoV DNA was detected in 3% of children under the age of 2 years, who applied with the complaint of respiratory tract infection, by using PCR method. Although the evidence about the pathogenicity of HBoV is increasing, more studies are needed to increase the knowledge about the disease and severity of HBoV.

Key Words: Human Bocavirus, Respiratory Virus, Childhood Infections

Giriş

Akut solunum yolu enfeksiyonları çocukluk çağı mortalite ve morbiditesinin en önemli nedenleri arasındadır. Hem ayaktan tedavinin hem hastaneye yatışların önemli bir sebebidir. Virüsler, solunum desteği gerektirebilecek çocukluk çağı alt solunum yolu enfeksiyonları ile de yakından ilişkilidir (1). İnfluenza virüsler, parainfluenza virüsler ve respiratuvar sinsitiyal virüs, solunum yolu enfeksiyonuna en sık sebep olan virüsler olarak bilinse de, bu enfeksiyonların bir kısmında da etken bulunmamaktadır. Son 10 yıl içinde gelişen moleküler yöntemler ve genomik amplifikasyon tekniklerindeki ilerlemeler önderliğinde insan metapnömovirüsü, insan koronavirüsleri HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-229E, şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüsü ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü; Ki ve Wv polyomavirüsleri ve insan bocavirüsü (HBoV) gibi çok sayıda yeni solunum yolu patojeni tanımlanmıştır. Geçmişte bilinen virüsler zaten azımsanmayacak kadar sık solunum yolu hastalığına neden olurken, yeni saptanan bu virüslerin de toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı üst ve alt solunum yolu hastalıklarında rol aldığı görülmektedir (2-6). HBoV, ilk defa 2005 yılında, pnömonili hastaların solunum yolu sekresyonlarından izole edilen yeni bir parvovirüstür. Keşfedildiğinden beri tüm dünyada, çocuklarda ve erişkinlerde üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu ve gastrointestinal sistem hastalıklarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Semptomatik olup hastaneye yatırılan çocuklardan alınan solunum yolu örneklerinden HBoV sekansı elde edilenlerin oranı %1,5 ile %19 arasında değişmektedir (5,7-9). HBoV ile enfekte olan çocukların çoğu 24 aydan küçüktür, fakat 24 aydan büyük çocukları da etkilemektedir. Hastaneye yatan ve hışırtılı solunumu olan çocukların ayaktan tedavi edilenlere göre daha ağır kliniği olduğu görülmüştür (5,7,8). Erişkinlerde de klinik bulgusu olan gruplar için az sayıda çalışma mevcuttur fakat yetişkinlerde solunum yolu örneklerinden yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizlerinde çok daha düşük prevalans saptanmıştır (5-9).

Bu çalışmada amaç, özellikle 2 yaş (0-24 ay) altındaki çocuklarda alt solunum yolu hastalığı etkeni olduğu düşünülen HBoV varlığının klinik uyumlu hastaların solunum yolu örneklerinde araştırılması ve bu yeni virüsün sıklığının moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

Mart 2009 - Kasım 2009 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Polikliniği'ne ve Çocuk Acil Servisi'ne başvuran ve akut solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulan iki yaş altı 200 çocuk hastadan alınarak -80 °C'de saklanan nazofarengeal aspirat örnekleri Mart 2010 - Haziran 2010 tarihleri arasında "in-house" PZR analizi kullanılarak çalışmaya alındı. Gestasyonel yaşı 36 haftanın ve doğum ağırlığı 2.500 gramın altında olan bebekler, kronik akciğer hastalığı ya da konjenital kalp hastalığı olanlar ve daha önce bronkodilatatör ya da steroid kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan onay alınarak hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onamlarının alınmasını takiben, nazofarengeal aspirat örnekleri çocuk sağlığı ve hastalıkları hekimi tarafınca toplandı (karar no: 154-4966).

İstatistiksel Analiz

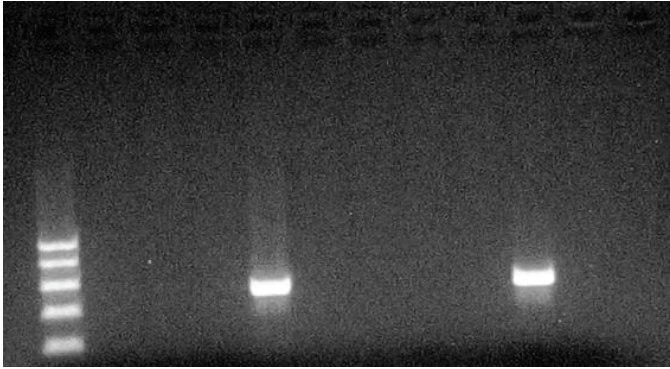
Örneklerden viral genom ekstraksiyonu E.Z.N.A Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek USA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimata göre yapıldı.

Primer seçimi NP1 proteinine göre yapıldı ve 354 bç'lik gen bölgesinin amplifikasyonu için 188F 5'-GAC CTC TGT AAG TAC TAT TAC-3' ve 542R 5'-CTC TGT GTT GAC TGA ATA CAG-3' primerleri kullanıldı (10). PZR amplifikasyon şartları, 94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, 94 °C'de 45 sn. denatürasyon, 58 °C'de 45 sn. bağlanma ve 72 °C'de 60 sn. uzamayı içeren 40 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra etidyum bromür ile boyanarak UV translüminatör altında incelendi. Beklenen baz çift büyüklüğüne (354 baz çifti) uygun olan ve HBoV hedef gen bölgesi olduğu düşünülen amplikonların, Mo Bio. Ultra Clean Gel Spin DNA Purification Kit ile jel ekstraksiyonu yapıldıktan sonra sekans analizi yapıldı.

Hastalara ait demografik verilerin (yüzelikler, ortalama, minimum-maksimum değerleri) analizinde SPSS paket programı (versiyon 18.0) kullanılmıştır.

Bulgular

HBoV saptanması amacı ile çalışmaya alınan 200 hastanın yaş ortalaması 7,4 ay (1 ay-24 ay) idi. Hastaların 113'ünde (%56,5)



Resim 1: HBoV PCR analizi. M: 100 bp moleküler büyüklük belirteci (marka, ülke)

NK: Negatif Kontrol. 1-3, 5-8, 10 no'lu örnekler negatif, 4 ve 9 no'lu örnekler pozitif

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, HBoV: İnsan bocavirüsü
retraksiyon, 61'inde (%30,5) $\geq 37,8$ °C ateş, 48'inde (%24) hışırtılı solunum tespit edildi. Hastaların altısının (%3) solunum yolu örneklerinde HBoV pozitif bulundu (Resim 1). Pozitif bulunan örneklerin doğru amplifikasyon ürünleri olduğunun ortaya konması için sekans analizi yapıldı ve amplifiye edilen dizinin, HBoV'ye ait beklenen ampikon olduğu doğrulandı.

HBoV pozitif bulunan hastaların 5 tanesi erkek, 1 tanesi kız idi. Bebeklerin yaşları 4-24 ay arasında değişmekteydi. Dörder hastada retraksiyon ve rinore, üçer hastada ateş ve öksürük ve iki hastada hışırtılı solunum tespit edildi. İki hastada retraksiyon ve hışırtılı solunum beraber görüldü.

Tartışma

Parvoviridae ailesinin insanlarda hastalık yapan tek üyesinin parvovirus B19 olduğu kabul edilmişken 2005 yılında Allander ve ark. (5), insan nazofarengeal aspirat örneklerinden daha önce bilinmeyen bir virüs keşfettiler. Kapsamlı sekans ve filogenetik analizler sonucu bu virüsün parvoviridae ailesinin bir üyesi olduğu bulundu. Çok küçük olan "bovine" ve "canine" parvovirüslerle çok yakın ilişkisi olduğu göz önüne alınarak bu virüse HBoV adı verildi. Sonraki çalışmalarla bu virüsle ilişkili iki virüs daha izole edildi ve geçici olarak HBoV-2 ve HBoV-3 olarak isimlendirildi. Bu virüs tanımlandıktan sonra, HBoV genomu tüm dünyada nazofarengeal yıkantılarda, serum ve dışkı örneklerinde sıklıkla görülmeye başlandı (5,11,12).

Allander ve ark.'nın (5) ilk çalışmasında çeşitli kliniklerde yatan 266 çocuk ve 112 erişkin hastaya ait olan nazofarengeal aspirat örneği değerlendirilmiştir. Kültürleri negatif çıkan bu örneklerin yedisinde (%1,8) HBoV DNA'sı bulunmuş, HBoV pozitif bulunan hepsinin de çocuklara ait olduğu tespit edilmiştir. Takiben retrospektif bir çalışma daha planlayan ekip, hastanede yatan 540 çocuk hastadan bir yıl boyunca topladıkları nazofarengeal aspirat örneklerini incelemiştir. Bunların 17'sinde (%3,1)

HBoV DNA'sı tespit edilmiş ve HBoV'nin, açıklanamayan solunum yolu enfeksiyonlarının etkeni olabileceği düşünülmüştür (5,6). 2005'ten beri dört insan bocavirüsü türü (HBoV1-4) tanımlanmış ve HBoV1'in solunum yolu örneklerinde yaygın olduğunu belgelemiştir. Pek çok asemptomatik taşıyıcı olabileceği de HBoV1'in semptomatik solunum yolu hastalıklarına neden olabileceği tartışılmaktadır (13).

Parvovirüsler dünya çapında yaygındır ve *in vitro* olarak üretilir, serolojik ve moleküler testlerle tespit edilebilirler. Ancak, test sonuçlarının dikkatli yorumlanması gerekir (14). HBoV1'in neden olduğu akut solunum yolu enfeksiyonlarında, olgularda en sık saptanan semptom, hışırtılı solunumdur (15). HBoV2 (12), HBoV3 (11), HBoV4 (16) ise klinik önemi belirsiz ancak insan hastalıklarıyla ilişkili olarak ortaya çıkan virüslerdir. Literatürde yer alan çalışmalarda, HBoV1'in şiddetli solunum yolu hastalığıyla ilişkili olabileceği tartışılmaktadır. Raporlarda, bu virüsün hastaneye yatmış bronşiyolitli, astım ataklı ve hışırtılı solunumu olan kişilerde görüldüğü bildirilmektedir. Bir prospektif çalışmada, solunum yolu enfeksiyonu yaptığı bilinen 16 virüs karşılaştırılmış, HBoV'nin tek ajan olarak saptandığı hastaların %50'sinden fazlasında hışırtılı solunum görülmüştür. (17) Diğer yaygın bulgular, takipne, ateş ve hipoksi olarak saptanmıştır. Hastaneye yatırılan ve HBoV pozitif olduğu tespit edilen çocukların hastaneye yatış sebeplerinin çoğunlukla pnömoni olduğu gözlenmiştir (6,17,18). Çalışmamızda, sayısı az olmakla birlikte, HBoV1 saptanan hastalarda, retraksiyon (%66,7), rinore (%66,7), ateş (%50), öksürük (%50) ve hışırtılı solunum (%33,3), semptom ve bulguları tespit edilmiştir.

Kaplan ve ark.'nın (18) Ürdün'de yaptıkları bir çalışmada, akut solunum yolu hastalığı sebebiyle hastaneye yatırılan 312 çocuk hastanın %18,3'ünde HBoV pozitif bulunmuştur. Fry ve ark.'nın (8) Tayland'da yaptıkları çalışmada ise; HBoV'nin hastanede yatan pnömoni hastalarda belirgin şekilde etken olabileceği bildirilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda, HBoV'nin iki veya daha fazla patojenle birlikteliği de göze çarpmaktadır. Çalışmaların birçoğunda yüksek ko-enfeksiyon oranı bildirildiği için HBoV'nin enfekte hastalarda asıl etken olduğunu söylemek zordur. Buna rağmen, semptomatik hastalarda sağlıklı kontrollere göre HBoV saptanma sıklığı daha yüksektir (8,19-22). HBoV, akut solunum yolu enfeksiyonu ile hastaneye yatırılan çocuk hastalardan alınan nazofarengeal aspiratların %7-18'inden izole edilmiştir (23).

Yalnızca nazofarengeal numunelerde virüsü saptamak için PZR tabanlı yöntemler kullanan çalışmaların dahil edildiği ve 6751 olguyu değerlendiren bir çalışmada; tek etken olarak ve diğer virüslerle birlikte HBoV enfeksiyonlarının oranları sırasıyla %4 ve %9 bulunmuştur. Akut bronşiyolitli çocukların %13'ünde HBoV saptandığı gösterilmiş ve bronşiyolitli çocuklarda solunum yolu enfeksiyonları için tanısal test panelinin bir parçası olarak düşünülebileceği bildirilmiştir (24). Bizim çalışmamızda

sadece HBoV varlığı değerlendirilmiş ve %3 HBoV pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde ve ülkemizde solunum yolu örneklerinde HBoV varlığını araştıran ilk çalışmadır. HBoV, 2011 yılından itibaren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Tanı Laboratuvarları'nda çalışılan solunum yolu enfeksiyon etkenlerini belirlemeye yönelik kullanılan ticari multiplex tanı panellerinde de yerini almıştır. 2011-2020 yılları arasında viral etken tespit edilen solunum yolu örnekleri arasındaki tek başına veya diğer etkenlerle birlikte görülme sıklığı %1,97 (2017 yılı) ile %7,84 (2012 yılı) arasında değişmiş, ortalama sıklığı %4,9 (547/11.239 pozitif örnek) olarak tespit edilmiştir (Prof. Dr. Z. Ceren KARAHAN, yayımlanmamış veri). Bu veriler de göstermektedir ki, solunum yolu enfeksiyon etkeni olarak önemi ortaya konduğu gündün beri HBoV solunum yolu enfeksiyon etkenleri arasında sahip olduğu payı korumaktadır.

Birçok virüs respiratuvar yolla bulaşır fakat semptom vermez. Hastalık için belirli bir ajanın etken olarak kabul edilmesi titizlikle değerlendirilmesi gereken bir süreçtir. Bu durum bir kültür sistemi ya da hayvan modeli yokluğunda daha da zorlaşır. Buna rağmen, HCoV veya insan rinovirüs suşlarının patojenitesi yeni tanımlandığı dönemlerde dahi tartışma konusu olmamış, tanımlanmış solunum yolu patojenleri ile genetik benzerliklerine dayanarak etken oldukları kabul edilmiştir. HBoV'deki durum farklı ve çeşitli nedenler yüzünden karışıktır. Birincisi, HBoV bilinen insan solunum yolu patojenleri ile ilişkisizdir. İkincisi, HBoV belki de diğer insan parvovirüsleri gibi asemptomatik persistans gösteriyor olabilir. Üçüncüsü, HBoV sıklıkla, solunum yolu patojeni olduğu kanıtlanmış diğer virüslerle birlikte solunum yolu örneklerinde saptanmıştır. Tüm bu değerlendirmeler, solunum yolu örneklerinde HBoV saptanmasının asemptomatik devamlılığa ya da viral saçılıma bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Diğer bir hipotez ise diğer solunum yolu ajanlarının replikasyonu sırasında HBoV ile geçici asemptomatik enfeksiyonun tetiklenebildiğidir (6,8,19,25-27).

Ülkemizde, bizim çalışmamızla yaklaşık eş zamanlı olarak yapılan ve sonuçları 2010 yılında yayımlanan HBoV ile ilgili ilk araştırma Midilli ve ark.'nın (28) çalışmasıdır. Bu çalışmada 5 yaş altı 76 çocuk hastaya ait örneğin beşinde (%6,5) ve 79 erişkin hastaya ait örneğin ikisinde (%2,5) HBoV DNA'sı saptanmıştır. Yine ülkemizden Uyar ve ark.'nın (29) yaptığı bir diğer çalışmaya 0-2 yaş arası akut bronşiyolit tanısı alan 62 çocuk ile kontrol olarak polikliniğe başvuran, öyküsünde bronşiyolit olmayan 33 çocuk dahil edilmiştir. HBoV oranı %4,8 (3/62) olarak bildirilmiştir. Yeşilbaş ve ark.'nın (30) yayımladıkları bir olgu sunumunda, iki gündür devam eden ateş, takipne, hipoksi ve solunum yetmezliği sebebiyle çocuk yoğun bakım ünitesinde takibe alınan ve yatışının ikinci gününde solunum sıkıntısı artan üç yaşında erkek çocukta, çalışılan viral solunum panelinde sadece HBoV pozitif olarak saptanmıştır. Hastanın akciğer grafisinde sağ akciğerde total pnömotoraks, pnömomediastinum, bilateral servikal

bölgede ve sol göğüs duvarında subkütan amfizem görüldüğü ve solunum yetmezliği nedeniyle entübe edilen hastaya mekanik ventilatör desteği başlandığı bildirilmektedir.

Çalışmamız 2 yaş altı çocuklarda solunum yolu enfeksiyon etkeni olarak HBoV araştıran, Türkiye'de yapılan ilk çalışmadır ve ülkemizde yapılan araştırmamızı takip eden diğer araştırmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Enfeksiyon sıklığının yıllar içinde değişmemesi, etkenin endemik olarak ülkemizde görülmeye devam ettiğini göstermektedir.

Sonuç

Sonuç olarak, HBoV'nin patojenitesi ile ilgili kanıtlar artmakla birlikte, HBoV'nin hastalıklarla ilişkisi ve şiddetiyle ilgili kesin bilgilere erişmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (karar no: 154-4966).

Hasta Onayı: Hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onamları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G., Dizayn: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G., Veri Toplama veya İşleme: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G., Analiz veya Yorumlama: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G., Literatür Arama: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G., Yazan: S.Y.A., F.Ş., D.T., D.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, et al. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol.* 2006;78:1232-1240.
2. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001;7:719-724.
3. Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1967-1976.
4. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:6212-6216.
5. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12891-12896.
6. Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44:904-910.
7. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, et al. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis.* 2006;43:283-288.

8. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.* 2007;195:1038-1045.
9. Lindner J, Modrow S. Human bocavirus--a novel parvovirus to infect humans. *Intervirology.* 2008;51:116-122.
10. Zeng M, Zhu QR, Wang XH, et al. Human bocavirus in children with respiratory tract infection in Shanghai: a retrospective study. *World J Pediatr.* 2010;6:65-70.
11. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis.* 2009;199:196-200.
12. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000391.
13. Guo L, Gonzalez R, Xie Z, et al. Bocavirus in children with respiratory tract infections. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1775-1777.
14. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30:43-113.
15. Jartti T, Hedman K, Jartti L, et al. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol.* 2012;22:46-64.
16. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis.* 2010;201:1633-1643.
17. Garcia MLG, Calvo C, Pozo F. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children: a 2-year study. *Arch Dis Child.* 2009;94:249.
18. Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, et al. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1418-1420.
19. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, 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;194:1276-1282.
20. Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, et al. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol.* 2007;38:321-325.
21. von Linstow ML, Høgh M, Høgh 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.
22. Chieochansin T, Thongmee C, Vimolket L, et al. Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61:479-481.
23. Song JR, Jin Y, Xie ZP, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:324-327.
24. Falahi S, Sayyadi H, Abdoli A, et al. The prevalence of human bocavirus in <2-year-old children with acute bronchiolitis. *New Microbes New Infect.* 2020;37:100736.
25. Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:18-33.
26. Lefrère JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, et al. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood.* 2005;106:2890-2895.
27. Kantola K, Hedman L, Allander T, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46:540-546.
28. Midilli K, Yılmaz G, Türkoğlu S, et al. Detection of human bocavirus DNA by polymerase chain reaction in children and adults with acute respiratory tract infections. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44:405-413.
29. Uyar M, Kuyucu N, Tezcan S, et al. Determination of the frequency of human bocavirus and other respiratory viruses among 0-2 years age group children diagnosed as acute bronchiolitis. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48:242-258.
30. Yeşilbaş O, Kıtır HS, Talip Petmezci M, et al. Very rare and life-threatening complications of bocavirus bronchiolitis: Pneumo mediastinum and bilateral pneumothorax. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50:159-164.