Bocavirus humano en Chile: características clínicas y epidemiológicas en niños con infecciones respiratorias

Juan C. Flores C., Cecilia Vizcaya A., Rafael Araos B., Luisa Montecinos P., Paula Godoy M., Fernando Valiente-Echeverría, Cecilia Perret P., Patricia Valenzuela C., Tamara Hirsch B. y Marcela Ferrés G.

Pontificia Universidad
Católica de Chile, Santiago.

Facultad de Medicina
División de Pediatría (JCF, CVA, CPP,
PVC, THB, MFG).

Laboratorio de Infectología y
Virología Molecular
Centro de Investigaciones Médicas
(JCF, CVA, RAB, LMP, PGM, FVE,
CPP, MFG).

Departamento de Medicina Interna
(RAB)*.

Conflictos de interés ninguno

Fuentes de financiamiento: Los
autores agradecen a Laboratorio
Roche por proveer Light Cycler
reaction kit.

*Actualmente en Universidad
del Desarrollo, Departamento de
Infectología.

Recibido: 14 de junio de 2011
Aceptado: 30 de agosto de 2011

Correspondencia a:

Marcela Ferrés G.
mferrés@med.puc.cl

Human bocavirus in Chile: clinical characteristics and epidemiological profile in children with acute respiratory tract infections

Background: Human bocavirus (HBoV) is a newly discovered parvovirus found in children with acute respiratory tract infections (ARTI). Objectives: To describe the epidemiological and clinical profile of children < 5 years old consulting for ARTI, comparing cases of HBoV mono-infection and coinfection with other known respiratory viruses. Furthermore, we aimed to estimate the prevalence of viral shedding in asymptomatic children and perform phylogenetic analysis. **Patients and Methods:** We investigated the presence of HBoV in nasopharyngeal secretions from children consulting for ARTI and among asymptomatic controls, between 2007 and 2008, by polymerase chain reaction. **Results:** HBoV was detected in 79 (21.8%) of 362 nasopharyngeal swabs obtained from children with ARTI. In 60/79 (76%), coinfection with other respiratory viruses was confirmed. Most common symptoms were cough, fever and rhinorrhea. Children infected only with HBoV showed significantly lower frequencies of respiratory distress, oxygen requirements and hospital admission than those with coinfection. HBoV was detected in 6/16 (37.5%) samples from asymptomatic children. The phylogenetic analysis of viruses from Chilean patients revealed that circulating HBoV was closely related to original strains. **Conclusions:** HBoV was found either in symptomatic and asymptomatic children. The severity of the disease was greater when HBoV was associated to other respiratory viruses.

Key words: Human bocavirus, children, infants, respiratory tract infection.

Palabras clave: Bocavirus humano, niños, infección respiratoria aguda.

Introducción

En el año 2005, Allander y cols., describieron un nuevo parvovirus humano procedente de muestras de niños con infecciones respiratorias agudas (IRA). Fue llamado bocavirus humano (HBoV), perteneciente al género *Bocavirus*, y a la familia *Parvoviridae*¹. Desde su descubrimiento se han descrito cuatro grupos o "clades" (HBoV 1-4), asociados con infecciones respiratorias y gastrointestinales en países de todo el mundo²⁻⁴.

Diversos estudios han reportado la presencia de HBoV en el tracto respiratorio, utilizando técnicas de biología molecular, con frecuencias que varían entre 1,5 y 19% entre niños con IRA⁵⁻¹⁵, y entre 0 y 43% en muestras respiratorias de pacientes asintomáticos^{7,14,16-20}. Por otra parte, se ha descrito co-infección con otros agentes virales, principalmente virus respiratorio sincicial (VRS) y adenovirus, entre 9 y 90%^{13,16}. Otros estudios han sugerido la excreción asintomática de HBoV en pacientes bajo un año de edad (8,6%), que puede prolongarse hasta por seis meses^{20,21}.

Con el objetivo de describir el perfil clínico y epidemiológico de este nuevo virus en pacientes bajo 5 años

de edad en Chile, diseñamos un estudio para evaluar la presencia de HBoV en pacientes que consultaron por IRA, y en niños asintomáticos. Comparamos dos cohortes de pacientes: aquellos con muestras positivas para HBoV como único agente identificado, y los que tenían una co-infección con otro virus respiratorio. Además evaluamos su excreción viral en un grupo de niños asintomáticos a través de reacción de polimerasa en cadena (RPC) y realizamos análisis filogenético de las cepas chilenas para compararlas con las descritas en otros países.

Material y Métodos

Diseño del estudio. Estudio de cohorte no concurrente, aprobado por el Comité de Ética de la Dirección de Investigación, Pontificia Universidad Católica (PUC) de Chile.

Pacientes sintomáticos. Los pacientes se reclutaron desde dos fuentes. Entre marzo y noviembre de 2007, se enrolaron niños bajo 5 años de edad que consultaron por IRA en centros ambulatorios donde se les tomó una muestra de hisopado nasofaríngeo (HNF) como parte de

un programa de vigilancia activa de virus respiratorios circulantes en Santiago, Chile. En segundo lugar, entre mayo y agosto de 2007 se incluyeron niños bajo 5 años de edad con IRA hospitalizados, o que consultaron en el Servicio de Urgencia o centros ambulatorios de nuestra institución, cuyas muestras fueron recibidas en el Laboratorio de Infectología y Virología Molecular para diagnóstico etiológico.

Grupo control. Los niños asintomáticos se reclutaron entre pacientes que acudieron a control sano habitual o que ingresaron al hospital para cirugía electiva u otro procedimiento. Los criterios de inclusión fueron: ausencia de síntomas respiratorios en los 10 días previos y edad menor a 5 años. Si el resultado de la RPC para HBoV era positivo, se realizó un seguimiento telefónico para evaluar aparición de síntomas respiratorios dentro de 7 días posteriores a la toma de muestra.

Características biodemográficas. Se registraron variables clínicas y demográficas en una base de datos, incluyendo: edad, sexo, fecha de obtención de HNF, síntomas, diagnóstico, patrón radiológico, ingreso al hospital, requerimiento de oxígeno y tratamiento recibido. Se revisó la ficha clínica y se contactó a los pacientes por teléfono para realizar su seguimiento. Se compararon los resultados entre los pacientes que tenían HBoV como único agente identificado, con aquellos en que se demostró co-infección con otro virus respiratorio.

Definiciones clínicas. IRA fueron definidas como cualquiera de los siguientes diagnósticos: infección respiratoria alta (presencia de rinorrea y/o tos, con o sin fiebre, y ausencia de dificultad respiratoria y signos de neumonía u obstrucción de vía aérea), bronquiolitis (primer o segundo episodio de sibilancias en lactantes bajo 2 años de edad, con signos y síntomas de infección viral y dificultad respiratoria), sibilancias recurrentes (tres o más episodios de sibilancias), o neumonía (infección respiratoria con imágenes de relleno alveolar en la radiografía de tórax).

Muestras clínicas y métodos de diagnóstico virológico. Las muestras respiratorias se obtuvieron utilizando tómulas de dacrón para HNF, y trasladadas el mismo día al laboratorio a una temperatura de 4°C en medio de transporte viral. Las muestras se estudiaron utilizando técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) para virus respiratorio sincicial (VRS), adenovirus (ADV), virus influenza (Flu) A y B, parainfluenza (paraFlu) 1, 2, 3 y metapneumovirus humano (MNVh) (D3 UltraTM DFA Respiratory Virus and MPV. DHI, California, USA)®. Las muestras negativas para MNVh por IFD se estudiaron además mediante técnica de RPC con transcriptasa reversa según la técnica descrita por Mackay²². Todas las muestras

fueron procesadas en el Laboratorio de Infectología y Virología Molecular de la Facultad de Medicina, PUC de Chile.

Técnica de RPC. El ácido nucleico se extrajo desde las muestras utilizando High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El genoma viral se estudió siguiendo el protocolo descrito por Xiaoyan Lu, 2006²³, utilizando partidores del gen *nsI* (290 pb) (*forward*: 5'-TAT GGC CAA GGC AAT CGT CCA AG-3', *reverse*: 5'-GCC GCG TGA ACA TGA GAA ACA GA-3').

RPC convencional. La RPC se realizó en una mezcla de 12,5 µL que contenía: 2,5 µL de tampón de reacción 5x (Flexi Taq, Promega), 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,75 µL de partidor *forward* (10µM), 0,75 µL de partidor *reverse* para el gen *nsI* (10µM), Taq polimerasa (Go Taq Flexi, Promega) 2,5 unidades/µL, 5 µL de ADN, y agua libre de nucleasa. Después de preparar la mezcla, se realizó un paso de denaturación de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 s, 65°C por 30 s, 72°C por 30 s y 7 min de extensión final a 72°C), en el equipo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). El fragmento amplificado de 290 pb se visualizó en un gel de agarosa al 2%. El primer fragmento amplificado de HBoV se secuenció en el Laboratorio de Diversidad Molecular, PUC de Chile, y fue comparado con las secuencias publicadas en GenBank para confirmación. Luego se utilizó como control positivo para el estudio. La identidad genética resultó ser de 99% para el gen *nsI* de HBoV (número de acceso: DQ988934-2).

RPC en tiempo real. HBoV se estudió en el grupo de niños asintomáticos mediante RPC en tiempo real buscando el gen *nsI*, como se describe anteriormente, utilizando el equipo Light Cycler® Fast Start DNA Master Syber Green I Kit (Roche). La mezcla de 10 µL contenía: 6,2 µL de agua libre de nucleasa, 0,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de partidor *forward* (10µM), 0,5 µL de partidor *reverse* para el gen *nsI* (10µM), 1 µL de LC Fast start reaction mix, y 1 µL de ADN. La amplificación se realizó utilizando el equipo Light Cycler (Roche) siguiendo los siguientes pasos: 95°C de preincubación por 10 s; 32 ciclos que consistían en: 95°C por 10 s, 63°C por 5 s, y 72°C por 12 s. Curva de *melting* 95°C por 0 s, 65°C por 15 s y 95°C por 0 s. La temperatura de *melting* para el control positivo fue 85°C, considerando como positivos valores de 85 ± 1°C. Se utilizaron precauciones estándares en la extracción de las muestras y en la realización de la RPC para evitar contaminación.

Análisis filogenético. Para realizar el análisis filogenético, se amplificaron fragmentos de los genes *nsI* y *vpI*

Figura 1. Arriba, productos de RPC amplificando gen *vp1* de HBoV obtenido de seis muestras de niños chilenos. Los resultados positivos se indican por una banda de 579 pb (líneas 1 a 6). Abajo, productos de RPC amplificando gen *ns1* de HBoV obtenido de seis muestras de niños chilenos. Los resultados positivos se indican por una banda de 291 pb (líneas 1 a 6). Línea C-: control negativo; línea MW: Ladder de ADNA de 1 Kb.

Figura 2. Distribución estacional de 79 muestras positivas para HBoV en niños bajo 5 años de edad, Santiago, Chile, 2007.

de seis pacientes chilenos de acuerdo al protocolo descrito por Sloots en el año 2006¹². Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y purificados para posterior secuenciación del ADN (Figura 1). Los fragmentos VP1 y NS1, de 579 pb y 291 pb respectivamente, se secuenciaron (MacroGen Inc, Bethesda, Maryland, USA) y se analizaron para obtener relaciones filogenéticas. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa Clustal W²⁴. Los árboles filogenéticos basados en la secuencia de los genes *ns1* y *vp1* se construyeron por el método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*), y la matriz de distancia se calculó a través del método Kimura (*two-parameters*)²⁵. La estabilidad se estimó por análisis de confianza (*bootstrap*) de 1.000 repeticiones. El cálculo de distancias matrices y la construcción de los árboles filogenéticos se realizaron utilizando el software MEGA 4.0²⁵.

Los números de acceso a GenBank para las secuencias de HBoV utilizadas en la construcción del árbol filogenético fueron las siguientes: *CU74W* EU262979; *CU8N* EU262978, *Bovine parvovirus-1 strain Abinanti* BPV DQ335247; *HK20* EF450736; *HK10* EF450726; *HK1* EF450717; *CU6* EF203920; *WLL-3* EF584447; *WLL-2* EF441262; *BJ3722* DQ988934; *CU74* EF203922; *CU49* EF203921; *BJ3064* DQ988933; *WLL-1* DQ778300; *CRD2* DQ340570; *st2* DQ000496; *st1* DQ000495; *Minute virus of canines strain: HM-6* MCV AB158475.

Análisis estadístico. Las variables continuas se presentan como mediana y rango, y las variables categóricas como frecuencia y porcentaje.

Las características clínicas se compararon utilizando el test exacto de Fisher y el test *U* Mann-Whitney.

Se consideró un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versión 15.0.

Resultados

Detección viral. Se detectó HBoV en 79 muestras (21,8%) de un total de 362 HNF obtenidos en niños bajo 5 años de edad con IRA. En 24% (19/79) de las muestras positivas, HBoV fue el único agente identificado, y en 76% (60/79) se detectó co-infección con otro agente viral: VRS en 65% (39/60), paraFlu en 13,3% (8/60), MNVh en 13,3% (8/60), ADV en 8,3% (5/60) y virus Flu B en 3,3% (2/60).

Distribución estacional. Los casos positivos para HBoV se detectaron entre los meses de marzo y noviembre. La mayoría (63,3%) se concentró en el período de invierno del hemisferio sur (junio y julio) (Figura 2).

Características clínicas y demográficas. Se describen en 62 pacientes, sobre un total de 79 que resultaron ser positivos para HBoV. Los síntomas más frecuentes fueron tos (97,9%), fiebre (89,7%) y rinorrea (89,7%). Se constató diarrea en 26,5% de los pacientes positivos para HBoV. Bronquiolitis y sibilancias recurrentes fueron los diagnósticos más frecuentes, consignados en más de 50% de los casos. El antecedente de asma o sibilancias recurrentes estaba presente en 32,7% de los pacientes. El patrón radiográfico más frecuente fue compromiso intersticial, en 43,4% (10/23) del total de casos en quienes se consideró necesaria la evaluación con radiografía de tórax. Al comparar los pacientes con HBoV como único agente identificado con aquellos con co-infección, este último grupo mostró mayor gravedad en la presentación clínica, con una diferencia estadísticamente significativa.

en tres variables analizadas: dificultad respiratoria, requerimiento de oxígeno y hospitalización (Tabla 1). Los pacientes positivos para HBoV tenían bajo 2 años en 69,6% de los casos (Figura 3). Además se observa que a mayor edad, existe una disminución progresiva de los pacientes positivos para HBoV.

Grupo control. Se analizaron 16 muestras obtenidas en niños asintomáticos, utilizando RPC convencional y en tiempo real. Se detectó HBoV en 3 (18,8%) y 6 (37,5%) muestras de HNF, respectivamente. Durante el seguimiento, un paciente que resultó positivo por ambas técnicas, presentó síntomas respiratorios (laringitis aguda) antes de siete días desde la toma de muestra.

Análisis filogenético. Los fragmentos amplificados de los genes *ns1* y *vp1* de HBoV obtenidos desde muestras chilenas se secuenciaron según se detalla en la sección Materiales y Métodos. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se muestra en la Figura 4. Las secuencias nucleotídicas de los virus obtenidos desde muestras chilenas están fuertemente relacionadas con los genotipos *st1* y *st2* descritos por Allander en Suecia¹. La mayoría de los polimorfismos identificados en este estudio no se tradujeron en cambios a nivel aminoacídico de los productos génicos correspondientes.

Discusión

Nuestro estudio encontró presencia de genoma viral de HBoV en 21,8% de las muestras de HNF obtenidas en pacientes bajo de edad 5 años que consultaron por IRA, y en 18,8% en niños asintomáticos, usando RPC convencional. Se detectó co-infección en 76% de las muestras positivas para HBoV. Este grupo mostró una presentación clínica más grave al compararlo con los pacientes en quienes se identificó HBoV como agente único, de los cuales ninguno requirió ingreso al hospital.

La prevalencia real de HBoV en pacientes con IRA utilizando técnicas de biología molecular probablemente está subestimada, considerando la mayor sensibilidad que ha demostrado tener la RPC en tiempo real. Esto fue observado en nuestro estudio al comparar las muestras positivas entre las dos técnicas en el grupo de asintomáticos (37,5 vs 18,8%).

Desde que HBoV fue descrito por Allander y cols. en 2005, se han publicado varios artículos con información epidemiológica y virológica realizados en países de América, Europa, Asia, Oceanía y África⁵⁻¹⁵. Nuestro estudio reporta una prevalencia más alta en niños con IRA (21,8%), al compararla con los datos reportados en la literatura: de 1,5% a 19%⁵⁻¹⁵. Probablemente esta diferencia se explica porque nuestras muestras fueron

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de 62 pacientes chilenos con infección por HBoV

	HBoV ag único	Co-infección	Valor-p
Edad, meses [§]	12,5 (2-47)	20,5 (2-58)	0,3
Sexo, masculino/femenino	5/11	28/18	0,08
Síntomas (%)			
Fiebre	14/16 (87,5)	30/33 (90,9)	0,89
Rinorrea	15/16 (93,7)	29/33 (87,8)	0,89
Tos	16/16 (100)	32/33 (96,9)	0,71
Polipnea o dificultad respiratoria	4/16 (25)	25/33 (75,7)	0,002*
Diarrea	5/16 (31,3)	8/33 (24,2)	0,86
Compromiso del estado general	13/16 (81,2)	29/33 (87,8)	0,85
Vómitos	5/16 (31,3)	12/33 (36,3)	0,97
Disfonía	3/16 (18,7)	11/33 (33,3)	0,47
Conjuntivitis	3/16 (18,7)	8/33 (24,2)	0,95
Diagnóstico (%)			
Bronquiolitis	6/16 (37,5)	10/33 (30,3)	0,86
Sibilancias recurrentes/asma	6/16 (37,5)	10/33 (30,3)	0,86
Neumonía	1/16 (6,2)	6/33 (18,1)	0,49
1° episodio sibilancias < 2 años	0/16 (0)	4/33 (12,1)	0,37
Infección respiratoria alta	4/16 (25)	3/33 (9)	0,29
Patrón radiológico (%)			
Intersticial	3/8 (37,5)	7/15 (46,6)	0,98
Intersticial + neumonía	1/8 (12,5)	3/15 (20)	0,9
Atelectasia	1/8 (12,5)	2/15 (13,3)	0,55
Normal	2/8 (25)	2/15 (13,3)	0,9
Manejo (%)			
Ingreso al hospital	0/16 (0)	11/36 (30,5)	0,03*
Requerimiento de oxígeno	0/16 (0)	11/36 (30,5)	0,03*
Broncodilatadores	10/16 (62,5)	21/26 (80,7)	0,34
Corticoesteroides	2/16 (12,5)	6/26 (23)	0,66
Antimicrobianos	8/16 (50)	17/34 (50)	0,76

*Estadísticamente significativo, p < 0,05, §Mediana (rango).

Figura 3. Distribución por edad de 79 pacientes con muestras positivas para HBoV en pacientes bajo 5 años de edad, Santiago, Chile, 2007.

Figura 4. Análisis Filogenético. Árboles filogenéticos contruidos en base al método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*) utilizando la secuencia nucleotídica (panel izquierdo) y la secuencia de aminoacídica (panel derecho) de los genes *ns1* (A), *vp1* (B) y sus productos génicos, respectivamente. Los valores de confianza (*bootstrap*) se indican en cada rama; *st1* y *st2*: cepas originales descritas por Allander¹; PedCHI: cepas HBoV de niños chilenos. Además de señala la fecha de la obtención de la muestra para cada cepa. Escala en el extremo inferior izquierdo indica 0,05 sustituciones por nucleótido.

obtenidas en su mayoría en período de invierno, donde la circulación de virus respiratorios es mayor. La distribución por edad de los pacientes positivos para HBoV fue similar a lo reportado: principalmente niños entre 6 meses y 2 años de edad^{1,7,8,9,11,14,16,17}. La presentación clínica tampoco fue diferente a lo ya descrito: tos, fiebre y rinorrea fueron los síntomas más frecuentes encontrados en nuestros pacientes, y además 25% tuvo diarrea. El rol

de HBoV como causa de crisis asmáticas también ha sido sugerido por algunos trabajos²⁶⁻²⁸. El antecedente de asma o sibilancias recurrentes estaba presente en alrededor de 1/3 de nuestros pacientes, tanto en los que tenían HBoV como agente único, como en los co-infectados con virus que clásicamente se presentan con sibilancias (VRS). La principal diferencia entre ambos grupos fue la gravedad de los síntomas.

El rol de HBoV en IRA ha sido cuestionado por varios motivos. Primero, la mayoría de los estudios han usado técnicas diagnósticas basadas en biología molecular (RPC). Un resultado positivo en este contexto puede significar infección aguda o excreción viral prolongada de partículas virales, vivas o inactivadas²⁸. Un gran número de pacientes se presentan con cargas virales bajas^{14,23,29,30}, y ha sido demostrada su excreción hasta por 6 meses^{20,21}, lo cual sugiere persistencia del virus por períodos prolongados. Además, varios estudios han reportado alta prevalencia de HBoV en pacientes asintomáticos, entre 5 y 43%¹⁸⁻²⁰, altas tasas de co-infección con otros virus, y su presencia en deposiciones³¹⁻³⁴, suero^{9,14} y orina¹³, lo cual sugiere una infección sistémica.

En nuestro estudio encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo en que HBoV fue agente único, en comparación al grupo con co-infección (principalmente VRS), en tres variables que reflejan mayor gravedad: dificultad respiratoria, hospitalización y requerimiento de oxígeno. Esto podría sugerir que HBoV como patógeno respiratorio tendría una repercusión clínica limitada, cuestionando su rol patogénico en IRA.

Por otra parte, nueva evidencia apoya el rol de HBoV como patógeno respiratorio en niños. Allander y cols.¹⁴, sugiere una teoría en que cargas virales altas de HBoV estarían asociadas con síntomas respiratorios y viremia, indicando infección sistémica, mientras que cargas virales bajas en secreciones respiratorias podrían indicar excreción asintomática. El estudio de Kantola y cols.³⁵, encontró viremia y altas cargas virales en secreciones nasofaríngeas en un subgrupo de pacientes con sibilancias y ausencia de otros virus respiratorios. Además todos ellos mostraron evidencia serológica de infección aguda.

Pocos estudios han evaluado la respuesta inmune a HBoV, principalmente por la dificultad en obtener antígenos virales recombinantes y métodos de diagnóstico estandarizados³⁵⁻³⁹. Un inmunoensayo basado en la proteína 2 (VP2) fue desarrollado por Söderlund-Venermo y cols.⁴⁰. El examen mostró una sensibilidad de 97% y especificidad de 99,5%. En este estudio, un total de 48 (19%) de 258 niños con sibilancias tenían evidencia serológica de infección primaria por HBoV. Otro estudio reciente realizado por Don y cols.⁴¹, utilizó el mismo método para estudiar a 101 niños ingresados por neumonía. Se encontró evidencia serológica de infección aguda en 12% de los pacientes. Además, la seropositividad a HBoV se incrementó con la edad, alcanzando casi 100% en adultos^{40,41}. La presencia de IgM específica para HBoV, además de un incremento en la IgG ha sido descrito como un método sensible para diagnóstico de infecciones agudas y ha aportado evidencia importante en aclarar el rol patogénico de este agente en IRA. La serología es usada en forma rutinaria para diagnóstico de infecciones por parvovirus B19, y en forma similar, debería llegar a

ser el examen de elección para diagnóstico de HBoV^{38,42}.

La importante similitud entre cepas chilenas y las descritas originalmente en el hemisferio norte, basado en el análisis filogenético, sugiere que HBoV es un virus altamente conservado, y exámenes serológicos deberían tener aplicación e interpretación universal en todo el mundo.

Nuestro estudio tiene limitaciones que se deben considerar en el análisis. Considerando la evidencia actual, la RPC cualitativa no es el método de elección para describir y estudiar un virus que se excreta en forma asintomática por períodos prolongados^{20,21}. Algunos datos fueron obtenidos en forma retrospectiva, lo cual podría tener influencia en los resultados ("recall bias" o error de memoria), y se reclutaron pocos niños asintomáticos.

En conclusión, HBoV está presente en población chilena, y cuando se detecta otro agente viral en la muestra respiratoria, se evidencia una expresión clínica de mayor gravedad. La evidencia actual ha demostrado excreción viral por períodos prolongados, lo cual podría explicar su presencia en niños asintomáticos. Esto a su vez hace que las técnicas cualitativas de biología molecular no sean la técnica más adecuada para estudiar la epidemiología y realizar diagnóstico de infección aguda. En este ámbito, la serología se perfila como el método de elección.

Agradecimientos. Los autores agradecen a todos los niños y padres que participaron en este estudio, al laboratorio Roche por proveer de Light Cycler reaction kit, a los estudiantes de medicina Alex Arenas, Javiera Pardo y Daniela Gutiérrez por su ayuda en la recolección de los datos, y a los doctores José Antonio Castro-Rodríguez, Marcelo López y Paul Harris por su gentil revisión de este manuscrito.

Resumen

Introducción: Bocavirus humano (HBoV) es un nuevo parvovirus encontrado en niños con infecciones respiratorias agudas (IRA). *Objetivos:* Describir la epidemiología y perfil clínico en niños ≤ 5 años con IRA, comparando aquellos con HBoV como único agente identificado, con los que tenían co-infección con otro virus respiratorio. Además se evaluó su prevalencia en niños asintomáticos, y se realizó análisis filogenético. *Materiales y Métodos:* Se investigó la presencia de HBoV, por medio de reacción de polimerasa en cadena, en muestras de secreción nasofaríngea obtenida en niños con IRA y en controles asintomáticos, entre 2007 y 2008. *Resultados:* Se detectó HBoV en 79 (21,8%) de 362 muestras obtenidas en pacientes con IRA. En 60/79 (76%), se demostró co-infección. Los síntomas más frecuentes fueron tos, fiebre y rinorrea. Los pacientes con HBoV como único agente identificado mostraron frecuencias significativamente menores de dificultad

respiratoria, requerimiento de oxígeno y hospitalización, comparado con los co-infectados. HBoV se detectó en 6/16 (37,5%) muestras de niños asintomáticos. El análisis filogenético de las cepas chilenas demuestra estrecha

relación con las cepas originales. *Conclusiones:* HBoV está presente en niños chilenos con IRA y asintomáticos. La gravedad de la enfermedad fue mayor en el grupo con co-infección.

Referencias

- 1.- Allander T, Tammi M T, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12891-6.
- 2.- Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P. Absence of detectable replication of human bocavirus species in respiratory tract. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1503-5.
- 3.- Song J R, Jin Y, Xie Z P, Gao H C, Xiao N G, Chen W X, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 324-7.
- 4.- 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.
- 5.- Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 848-50.
- 6.- Arnold J C, Singh K K, Spector S A, Sawyer M H. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children hospital. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 283-8.
- 7.- Kesebir D, Vázquez M, Weibel C, Shapiro E D, Ferguson D, Landry M L, 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.
- 8.- 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; 44: 1132-4.
- 9.- Qu X W, Duan Z J, Qi Z Y, Xie Z P, Gao H C, Liu W P, et al. Human bocavirus infection, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 165-8.
- 10.- Choi E H, Lee H J, Kim S J, Eun B W, Kim N H, Lee J A, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 585-92.
- 11.- Manning A, Russel V, Eastick K, Leadbetter G H, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194: 1283-90.
- 12.- Sloots T P, McErlean P, Speicher D J, Arden K E, Nissen M D, Mackay I M. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006; 35: 99-102.
- 13.- Pozo F, García-García M L, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007; 40: 224-8.
- 14.- Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters H G, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 904-10.
- 15.- 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.
- 16.- Fry A M, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell S F, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007; 195: 1038-45.
- 17.- Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. Human bocavirus in Italian patients with respiratory disease. *J Clin Virol* 2007; 38: 321-5.
- 18.- Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron M G, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 217-21.
- 19.- García-García M L, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S, Bracamonte T, et al. Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 358-60.
- 20.- von Linstow M L, 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.
- 21.- Brieu N, Guyon G, Rodière M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 969-73.
- 22.- Mackay I M, Jacob K C, Woolhouse D, Waller K, Syrmis M W, Whitley D M, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 100-5.
- 23.- Lu X, Chittaganpitch M, Olsen S J, Mackay I M, Sloots T P, Fry A M, et al. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3231-5.
- 24.- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 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; 22: 4673-80.
- 25.- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-9.
- 26.- Calvo C, García-García M L, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 677-80.
- 27.- Maffey A F, Barrero P R, Venialgo C, Fernández F, Fuse V A, Saia M, et al. Viruses and atypical bacteria associated with asthma exacerbations in hospitalized children. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 619-25.
- 28.- Arnold J C. Human bocavirus in children. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 557-8.
- 29.- Foulongne V, Rodière M, Segondy M. Human bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 862-3.
- 30.- Lin F, Zeng A, Yang N, Lin H, Yang E, Wang S, et al. Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 3.
- 31.- Lau S K, Yip C C, Que T L, Lee R A, Au-Yeung R K, Zhou B, et al. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis* 2007; 196: 986-93.
- 32.- Lee J I, Chung J Y, Han T H, Song M O, Hwang E S. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007; 196: 994-7.
- 33.- Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 636-7.
- 34.- Albuquerque M C, Rocha L N, Benati F J,

- Soares C C, Maranhão A G, Ramírez M L, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1756-8.
- 35.- 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.
- 36.- Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirakoohi R, Ma X, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3218-23.
- 37.- Kahn J S, Kesebir D, Cotmore S F, 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.
- 38.- Simmonds P. Steps towards serological diagnosis of human bocavirus infections. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 547-9.
- 39.- Lindner J, Karalar L, Schimanski S, Pfister H, Struff W, Modrow S. Clinical and epidemiological aspects of human bocavirus infection. *J Clin Virol* 2008; 43: 391-5.
- 40.- Söderlund-Venermo M, Lahtinen A, Jartti T, Hedman L, Kemppainen K, Lehtinen P, et al. Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1423-30.
- 41.- Don M, Söderlund-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.
- 42.- Young N S, Brown K E. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004; 350: 586-97.