



Akut Gastroenteritli Hastalarda İnsan Bokavirüsün Moleküler Yöntem ile Araştırılması

Molecular Detection of Human Bocavirus (HBoV) in Stool Samples in Patients with Acute Gastroenteritis

 Fadime Kahyaoglu¹,   Sevin Kırdar²

¹ Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa

² Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

ORCID ID: Sevin Kırdar, <https://orcid.org/0000-0002-4511-578X>, Fadime Kahyaoglu, <https://orcid.org/0000-0002-5149-8051>

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Prof. Dr. Sevin KIRDAR, e-posta / e-mail: sevin.kirdar@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 28-07-2020

Kabul Tarihi / Accepted: 14-10-2020

Yayın Tarihi / Online Published: 31-12-2020

Atf Gösterimi/How to Cite: Kırdar S., Kahyaoglu F. Akut Gastroenteritli Hastalarda İnsan Bokavirüsün Moleküler Yöntem ile Araştırılması, J Biotechnol and Strategic Health Res. 2020;4(3):256-261

Özet

Amaç Akut gastroenteritler tüm dünyada özellikle çocuk yaş grubunda daha fazla olmak üzere morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Gastroenterit etiyolojisinin ve epidemiolojisinin bilinmesi, etkin tedavi uygulanmasını yanı sıra gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesini ve ayrıca hastalık etkenleri ile mücadeleyle sağlamaktadır. Gastroenterite neden olan viral patojenler; rotavirus (RV), norovirus (NoV), sapovirus (SaV), adenovirus (AdV), astrovirus (AstV) ve bokavirüs (BoV)dur. Bu çalışmada Aydın ilinde akut gastroenteritli hastalarda insan BoV (HBoV) sıklığının ve tiplerinin moleküler yöntem ile araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metod Çalışmaya Eylül 2013 ile Ekim 2014 tarihleri arasında hastanemize başvuran akut gastroenteritli 44 (%46)'ü kadın, 52 (% 54)' si erkek olmak üzere toplam 96 hastaya ait dışkı örneği dahil edildi. İnsan BoV-DNA'sı NS-1 gen bölgesine uygun primer dizilerinin kullanıldığı real-time (gerçek zamanlı) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırıldı. Bokavirüs tiplendirilmesi tipe özgül real-time (gerçek zamanlı) PZR yöntemi ile ve koenfeksiyon varlığı ise multiplex PZR ile belirlendi.

Bulgular Çalışmada incelenen 96 dışkı örneğinin 2'sinin (% 2) HBoV pozitif olduğu belirlendi. Pozitif iki örnek, tipe özgül gerçek zamanlı PZR ile HBoV tip 1 olarak bulundu. Diğer bokavirüs tipleri saptanmadı. İnsan BoV tip 1 pozitif hastalar erkek cinsiyetinde ve 0- 2 yaş grubundaydı. İki hastada rotavirus ile koenfeksiyon gözlemlendi.

Sonuç Bu çalışma ile akut gastroenteritli hastalarda etiyolojik ajan olarak bokavirüsün da diğer sıklıkla saptanan viruslar gibi gastroenterite neden olabileceği belirlenmiştir. Gastroenteritlerde viral etkenlerin belirlenmesi, gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesini hem hasta maliyetini hem de patojenlerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesini azaltacaktır.

Anahtar kelimeler İnsan bokavirüs, gastroenterit, dışkı, real-time PZR

Abstract

Aim Acute gastroenteritis is the most important causes of morbidity and mortality, especially in children worldwide. To know the factors that cause gastroenteritis enables effective treatment as well as prevent the use of unnecessary antibiotics. Viral pathogens that cause gastroenteritis; rotavirus (HRV), norovirus (HNoV), sapovirus (HSaV), adenovirus (HAdV), astrovirus (HAsV) and bocavirus (BoV). The aim of study was to investigate the frequency and types of HBoV in patients with gastroenteritis by molecular methods in Aydın province.

Material and Method Between September 2013 and October 2014, a total 96 patients who were admitted to our hospital with stool samples were included. Forty four of patients were female and 52 were male. BoV-DNA was investigated by real-time PCR appropriate to NS-1 gene region. The typing of HBoV was determined by type-specific PCR and the coinfection of the other viruses was determined by multiplex PCR.

Results Two (2 %) of the 96 samples were determined to be HBoV positive. Two samples with positive were determined as HBoV type 1 by type specific real-time PCR. Other types of HBoV not detected. The positive patients for HBoV type 1 were 0-2 years old and male gender. Mixed infection with RV were observed in 2 (100%) patients.

Conclusion it was determined that bocavirus as an etiological agent in patients with acute gastroenteritis may cause gastroenteritis like other frequently detected viruses. The identification of viral agents in gastroenteritis will reduce both the cost of preventing unnecessary antibiotic use and the development of resistance to antibiotics in pathogens.

Key words Human Bocavirus, gastroenteritis, stool, real time PCR

GİRİŞ

İshal tüm dünyada çocuk yaş grubunda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Özellikle beş yaş altı çocuklarda ishal, gelişmekte olan ülkeler ile Afrika'da mortalitenin üçüncü en büyük nedenidir¹. Akut gastroenteritin en önemli bulgularından biri olan ishal akut dehidratasyona, neden olduğu malnutrisyon çocuklarda büyümenin etkilenmesine ve gereksiz antibiyotik kullanımına yol açması nedeni ile önem taşımaktadır². Viruslar, özellikle çocuk yaş grubunda, gastroenteritin en önemli nedeni olup rotavirus, norovirus, astrovirus ve adenovirus en sık saptanan viruslar olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda insanlarda ishal ile ilişkili viral ajanların sayısı giderek artmaktadır¹. Gastroenterit ile ilişkili yeni viruslardan biri olan insan bokavirüs (HBoV) ilk kez 2005 yılında Allander ve arkadaşları tarafından alt solunum yolu enfeksiyonu gözlenen çocukların solunum yolu örneklerinden belirlenmiş³ ve 2007 yılından bu yana gastroenteritli çocukların dışkı örneklerinde etken olarak dünyanın değişik bölgelerinden birçok çalışmada gösterilmiştir⁴⁻¹². Filogenetik analiz ile bokavirusların HBoV1-4 olmak üzere 4 alt tipden oluştuğu bildirilmiştir³. İnsan BoV1 sıklıkla çocuklarda solunum yolu hastalıkları ile ilişkili olup, aynı zamanda gastrointestinal semptomlarla da ilişkilidir^{3,12}. İnsan BoV2, BoV3 ve BoV4 sıklıkla dışkı örneklerinde nadiren solunum yolunda görülmektedir^{7,13,14}. İnsan bokavirus tip 2 ilk kez Pakistan'da gevşek paralizli hastaların dışkı örneklerinden izole edilirken, Avustralya'da HBoV2 yanı sıra HBoV3 izole edilmiştir¹⁴. Bu çalışmada hastanemize akut gastroenterit tanısı ile başvuran hastaların dışkı örneklerinde real time (gerçek zamanlı) polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile HBoV varlığının ve genotiplerinin araştırılmasını amaçlanmıştır. Ayrıca bokavirus pozitif bulunan hasta örneklerinde viral koenfeksiyon varlığı için diğer sık karşılaşılan gastroenterit etkeni viruslar multipleks PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

YÖNTEM

Eylül 2013-Ekim 2014 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Çocuk

Hastalıkları Polikliniği ve Acil Servisten Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına akut gastroenterit şüphesi ile gönderilen 44 (%46)'ü kadın, 52 (% 54)'si erkek olmak üzere toplam 96 hastaya ait dışkı örneği çalışmaya dahil edildi. Hastalardan alınan dışkı örnekleri dışkı kapları içinde çalışılncaya kadar -80°C de saklandı.

Hastaların yaş ortalaması 4 yıl (0-79) olarak belirlendi ve %51'i 0-24 ay grubunda yer almaktaydı. Hastaların yaş dağılımı Tablo1'de gösterilmiştir. Hastalar rastgele seçildi ve çalışma prospektif olarak yürütüldü. Çalışmada Tıbbi Etik Kurul Yönergesine göre hastaların bilgilendirilmiş onayları alındı (ADÜ-Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 11.09.2013 tarih ve 56989545/050.04-198 sayılı etik kurul kararı).

Dışkı örneklerinden DNA izolasyonu QIAampR Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği talimatlara göre yapıldı. HBoV varlığı ORF bölgesinden kodlanan NS-1 gen bölgesine uygun primer dizileri (Pan-HBoV-F; ATA AAG TTC CAA ACT CAT TTC CTC TTG Pan-HBoV-R; AGT GCA GWA TCC GTT TTC GTG (88 bp) kullanılarak belirlendi. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüplerine 0.6 µl distile su, 0.2 µl forward primer (0.4 µM) 0.2 µl (0.4 µM) revers primer ve 5 µl enzim karışımı (2x)'ından oluşan 6 µl PCR karışımı ve 4 µl DNA eklendi. Amplifikasyon, LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında 95 °C'de 15 saniye denatürasyon, 55°C'de 15 saniye bağlanma ve 72 °C'de 10 saniye uzama olmak üzere 40 siklus sonunda 60 °C'de 45 saniye ekstansiyon aşamaları ile gerçekleştirildi⁸. Pozitif örneklerin kantitatif sonuçları "absolute 25 quantitation second derivative" analizi kullanılarak "ct" değerleri ile cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Doğrulama amacıyla çoğaltılan PZR ürünleri %2 oranında hazırlanan agaroz jelde görüntülendi. Çalışmanın sınırlı bütçesi nedeniyle referans köken sağlanamadığı için pozitif kontrol olarak solunum yolu örneklerinde HBoV pozitif bulunan ve viral yükleri sırasıyla 4.106 (PK1) ve 4.102 (PK2) kopya/ml. olan iki klinik örnek kullanıldı.

Bokavirus pozitif örneklerin genotiplendirilmesi için özgül HBoV 1-4 primerleri [HBoV1: F; TCTCCGGCGAGTGAACATC ve RT1; CAT CCG GAT GAG GAG CGC (226 bç); HBoV2:F;TCTCCGGCGAGTGAACATCveRT-2primerGCTCTTCTCTTTCCAGTTTTTC(149bç);H-BoV3:F;TCTCCGGCGAGTGAACATCveF;TCTCCGGCGAGTGAACATC;HBoV4:F;TCTCCGGCGAGTGAACATCveRT4;GCCAATTTTCAGACTGGCAAAC (384 bp)] kullanılarak real time PZR yöntemi ile gerçekleştirildi ve pozitif örnekler melting analizi ile değerlendirildi.

Koenfeksiyon varlığı, diğer sık karşılaşılan gastroenterit etkeni virüsleri [enteric adenovirus (EAV), astrovirus (AsV), rotavirus grup A (RV grup A) ve norovirus (NoV) genogrup I ve II] belirleyebilen Seplex® Diarrhea ACE Detection multiplex PZR system (Seplex system; Seegene, Korea) kiti ile üretici firmanın talimatlarına göre araştırıldı.

BULGULAR

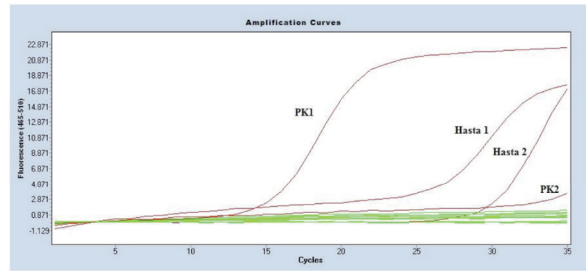
İnsan BoV varlığının tüm tipleri belirleyen pan-primerleri kullanılarak real time PZR yöntemi ile yapılan bu çalışmada 2 (%2) dışkı örneğinde pozitiflik saptanmıştır. İnsan BoV saptanan örnekler için amplifikasyon eğrileri şekil 1'de ve doğrulama amacıyla yapılan elektroforez sonucu pozitif saptanan hastalara ait jel görüntüsü şekil 2'de gösterilmiştir. Pozitif saptanan iki örnekte tipe özgül real time PZR yöntemi ile HBoV tip 1 belirlenmiştir. Bu iki örneğin viral yükleri birinci hastada 6.103 kopya/ml, ikinci hastada 4.102 kopya/ml olarak belirlenmiştir. HBoV tip 1 pozitif hastalar 0-2 yaş grubunda ve erkek cinsindeydi (Tablo 1). Hastaların her ikisi de solunum yolu enfeksiyon bulguları olmaksızın ishal ve kusma yakınmaları ile hastaneye başvurmuştu.

Çalışmada yer alan hasta örneklerinde viral koenfeksiyon varlığı multipleks PZR yöntemi ile araştırılmış ve HBoV tip 1 saptanan 2 hastada rotavirus ile mikis enfeksiyon belirlenmiştir.

Tablo 1. İnsan Bokavirus saptanan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

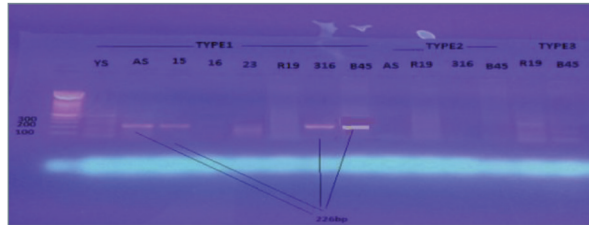
Hasta Yaş Grupları n(%)	HBoV PCR		HBoV Tip 1
	Pozitif	Negatif	Pozitif saptanan
0-12 ay, 17(17.7)	2*	15	2
2-12 y, 16 (16.7)	0	16	-
13-24 y, 16(16.7)	0	16	-
25-60 y, 36(37.5)	0	16	-
≥ 60 y ve üstü, 11(11.4)	0	11	-

*Erkek cinsinde



Şekil 1. HBoV pozitif saptanan hastaların amplifikasyon eğrileri

PK1, PK2: pozitif kontroller



Şekil 2. Tipe özgül real-time PZR ile pozitif HBoV Tip 1 saptanan hastaların agaroz jel görüntüsü. 316, B45: pozitif kontroller; AS, 15: hastalar

TARTIŞMA

Akut gastroenterit gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. Günümüzde çocukluk çağında akut gastroenteritlere neden olan etkenlerin çoğu viruslardır¹⁵. Allender ve ark. tarafından HBoV'un tanımlanmasından sonra, 2007 yılından sonraki çalışmalarda gastrointestinal semptomlar gösteren çocukların dışkı örneklerinde yaygın olarak pozitiflik saptanmış

ve bu virusun gastroenterite yol açtığı fikrinin ortaya atılmasını sağlamıştır. Vicente ve ark.'nın İspanya'da yaptıkları çalışma ile, ilk kez akut gastroenteritli çocukların dışkı örneklerinde HBoV pozitifliği bildirilmiş ve 527 hastanın 48'inde (%9,1) HBoV saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada, pozitiflik oranının yüksek bulunması akut gastroenterit olgularında etken olabileceğini düşündürmüştür⁵.

Akut gastroenteritli hastaların dışkı örneklerinde HBoV prevalansı %0.8 ile %24 arasında değişmektedir^{4,6,9-11,16-18}. HBoV prevalansının %42 ve %46 gibi çok yüksek oranlarda saptandığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır^{8,15}. Bokavirus çalışmalarında saptanma oranlarının bu değişkenliğin nedeni bokavirusun saptanma yöntemlerindeki farklılığa bağlı olabilir. Hastanemize başvuran akut gastroenterit tanılı hastalara ait 92 dışkı örneğinin dahil edildiği çalışmamızda 2 (%2) örnek HBoV pozitif olarak saptanmıştır. Belirlediğimiz bu oran Brezilya (%2), HongKong (%2.1), ve İtalya (%2)'da yapılan çalışmalarda 4,12,20 oranlar ile benzer, Kore (%0.18) ve Meksika (%1.3)'dan^{18,19} bildirilen oranlardan daha yüksek, Arnavutluk (%9.1) ve Çin(%17.3)'de bulunan oranlardan daha düşük bulunmuştur^{10,21}.

Ülkemizde, HBoV ile ilgili solunum yolu enfeksiyonu etkeni olarak gösterildiği çalışmalar yanı sıra akut gastroenterite neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır^{9, 22-24}. Gastroenterit ile ilişkili iki çalışmadan birinde; Mitui ve ark. beş yaş altındaki akut ishali çocuklarda yaptıkları çalışmada, Bangladeş'ten 138 ve Türkiye'den 150 olmak üzere toplam 288 dışkı örneğini incelemişler ve HBoV pozitifliğini sırasıyla 87 (%63) ve 13 (%8,7) olarak bulmuşlardır⁹. Sirekbasan ve ark. 0-5 yaş arası çocuklardaki akut gastroenteritlerde HBoV varlığı ve sıklığının araştırdıkları çalışmalarında 101 dışkı örneğinden 7(%6.9)'sinde HBoV pozitifliği saptamışlardır²⁴. Çalışmamızda belirlediğimiz %2'lik oran bu iki çalışmaya göre daha düşük olarak bulunmuştur. Bokavirüsüne bağlı akut gastroenteritler özellikle iki yaş altında olmak üzere en fazla çocuklarda görülmesinin yanında, erişkinlerde de

saptanabilir¹⁴. Çalışmamızda da HBoV pozitif saptanan 2 olgunun yaşları iki yaş altında olup, çocuklarda özellikle iki yaş altı çocuklarda bokavirüsün daha sık belirlendiği çalışmalara benzer bulunmuştur^{4,25,26}. Çalışmada HBoV tip-1 iki erkek hastada bulunmuş ve HBoV'ün cinsiyet ile ilişkisinin değerlendirildiği diğer çalışmalarda erkek hastalarda kadın hastalara oranla daha yüksek oranlarda görüldüğü bildirilmiştir^{12,27}. Tüm dünyada semptomatik hastalarda HBoV tiplerinin prevalansı, HBoV tip 1 için %1.5-94.8^{10,17,18,25,27}, HBoV tip 2 için %2.6-48^{6,9,18} arasında değişirken, HBoV tip 3 %1.6-2.6^{18,28} ve HBoV tip 4 için %3.2²⁸ olarak saptanmıştır. Akut gastroenteritli hasta örneklerinde HBoV1'in diğer tiplerden daha fazla oranlarda görüldüğünü bildiren çalışmaların^{10,18,25} yanısıra HBoV 2'nin diğer tiplere oranla daha yüksek oranlarda saptandığı çalışmalar da bulunmaktadır^{6,9}. Çalışmamızda HBoV pozitif bulunan iki örneğin tipe özgül real-time PZR ile tiplendirilmesi sonucunda ikisinin de HBoV tip 1 olduğu belirlenmiş ve Zhang ve ark' nın Çin' de, Lee ve ark Kore'de ve Netshikweta ve ark.'nın Güney Afrika'da yaptıkları çalışmalar ile benzer bulunmuştur^{27,29,30}. Bununla birlikte Proenca-Modena ve ark.'ları HBoVtip1'in gastroenteritdeki rolünün hala belirsiz olduğunu, HBoV tip1'in aslında solunum yolunda çoğaldığını ve yutulan nazofaringeal sekresyonların dışkıda virusun kontaminasyon kaynağı olabileceğini ileri sürmüşlerdir³¹.

Çalışmamızda viral koenfeksiyon varlığı multipleks PZR yöntemi ile araştırılmış ve HBoV saptanan 2 hastada rotavirus ile mikf enfeksiyon belirlenmiştir. Bokavirüsüne bağlı gastroenteritlerde koenfeksiyon oranları %60-%90 arasında değiştiği¹⁴ ve koenfeksiyonların araştırıldığı çalışmalarda, HBoV ile en fazla rotavirus olmak üzere norovirus ile koenfeksiyon belirlendiği bildirilmiştir^{10,18,22,25}. Çalışmamızda Arnavutluk, Pakistan, Çin ve Brezilya'da yapılan çalışmalara benzer şekilde en fazla rotavirus ile koenfeksiyon belirlenmiştir^{10,18,27}.

Gastroenterite neden olan HBoV enfeksiyonunun mevsimlerle ilişkisi tüm dünyada farklılıklar göstermektedir ve

en fazla sonbahar ve kış aylarında daha yüksek oranlarda görülmektedir^{12,16} Pakistanda yapılan bir çalışmada²⁵ kışın ve ilkbaharın sonunda (özellikle Ocak ve Mayıs ayında pik yaptığı) ve Çin'de yapılan bir çalışmada yaz ve ilkbaharın başında daha yüksek oranda saptandığı bildirilmiştir²¹. Çalışmamızda HBoV saptanan hastaların önceki çalışmalarına benzer şekilde sonbaharda hastaneye başvurdıkları belirlenmiştir^{12,16}. Sonuç olarak, bu çalışma ile akut gastroenteritli hastalarda bokavirusun da rotavirus, norovirus, adenovirus tip 40/41, astrovirus gibi gastroenterite neden olabileceği belirlenmiştir. İnsan BoV'un akut gastroenteritlerdeki rolüne yönelik yapılan çalışmalar tedavi ve epidemiyolojik açıdan çok önemlidir. Günümüzde daha çok solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda saptanmış olan bu virusun gastrointestinal sistem enfeksiyonlarındaki rolü ile ilişkili çalışmaların az sayıda olması nedeniyle ülkemizdeki önemi bilinmemektedir. Bu nedenle bu virusun çocukluk çağı gastroenteritlerindeki rolünü belirlemek amacıyla daha fazla moleküler ve epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır. Ayrıca gastroenteritlerde diğer viral etkenler gibi bokavirusun belirlenmesi de gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesini hem maliyeti hem de patojenlerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimini azaltabilecektir. Bunun yanında genotip belirleme gibi virolojik özelliklerinin ortaya konulması hastalıkların patogenezi, klinik özellikleri ve tanı stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olabilecektir. Bu çalışma, Fadime Kahyaoğlu'nun yüksek lisans tez yayınıdır ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TPF-14042 proje numarası ile desteklenmiş ve 16-18 Kasım, 2017 tarihinde Bulgaristan (Sofya)'da düzenlenen X. Balkan Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur, üçüncülük ödülü almıştır.

Kaynaklar

1. Rikhtoso MC, Kabue JP, Ledwaba SE, et al. Prevalence of Human Bocavirus in Africa and Other Developing Countries between 2005 and 2016: A Potential Emerging Viral Pathogen for Diarrhea. *J Trop Med* 2018, 12: 7875482.
2. Özkan A, Çocukluk çağı akut gastroenterit olgularında etiyolojik ajanların belirlenmesi. Uzmanlık tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana, Türkiye-2005.
3. De R, Liu L, Qian Y, et al. Risk of acute gastroenteritis associated with Human bocavirus infection in children: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12(9):e0184833.9
4. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13(11):1756-8.
5. Vicente D, G. Cilla, M. Montes, et al. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (4): 636-7.
6. Arthur Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis Australian children. *PLoSPathogens* doi.org/10.1371/journal.ppat.1000391.
7. Kapoor A, Simmonds P, Slikas B, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent enteric infections. *J Infect Dis* 2010 1; 201(11): 1633-43.
8. Nawaz S, Allen DJ, Aladin F, et al. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK. *PLoS One* 2012;7:e41346 doi: 10.1371/journal.pone.0041346.
9. Mitui MT, Bozdayi G, Ahmed S, et al. Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: a comparative study between Bangladesh and Turkey. *J Med Virol* 2014 Jul;86(7):1159-68.
10. La Rosa G, Della Libera S, Laconelli M, et al. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *J Med Virol* 2016; 88(5): 906-10.
11. Lee JI, Chung JY, Han TH, et al. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007; 196(7): 994-7.
12. Lau SK, Yip CC, Que TL, 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.
13. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol* 2010; 47: 143-47.
14. Schildgen O. Human Bocavirus: Lessons learned to date; *Pathogens* 2013, 2: 1-12.
15. Campos GS, Sampaio MLS, Menezes ADL, et al. Human Bocavirus in Acute Gastroenteritis in Children in Brazil. *J Med Virol* 2016; 88:166-70.
16. Romani S, Mohebbi SR, Khanyaghma M, et al. Detection of Human Bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis. *Gastroenterology Hepatology from Bed to Bench* 2013; 6:77-81.
17. Kim S. Prevalence of human bocavirus 1 among people without gastroenteritis symptoms in South Korea between 2008 and 2010. *Arch Virol* 2014;159 (10):2741-4.
18. Soares LS, Lima AB, Pantoja KC, et al. Detection and Molecular Epidemiology of Human Bocavirus in Children with Acute Gastroenteritis from Brazil. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/404632>.
19. Martinez MA, Soto-Del Rio Mde L, et al. DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 136-45.10
20. Rovida F, Campanini G, Piralla A, et al. Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77: 231-5.
21. Zhou T, Chen Y, Chen J, et al. Prevalence and Clinical profile of human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Chengdu, West China, 2012-2013. *J Med Virol* 2017; 89(10):1743-48.
22. Midilli K, Yılmaz G, Türkoğlu S, ve ark. Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve erişkinlerde insan bokavirüs DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Mikrobiyol Bul*, 2010; 44: 405-13.
23. Uyar M, Kuyucu N, Tezcan S, ve ark. Bronşiyolit Tanısı Alan 0-2 Yaş Grubu Çocuklarda İnsan Bokavirüs ve Diğer Solunum Virüslerinin Sıklığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(2):242-58.
24. Sirekbasan S, Midilli K, Akın Y, ve ark. Akut gastroenteritli çocuklarda human Bocavirus DNA varlığının araştırılması. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2017;74(4): 261-68.
25. Alam MM, Khurshid A, Shaikat S, et al. Human bocavirus in Pakistani children with gastroenteritis. *J Med Virol* 2015; 87: 656-63.
26. Wang Y, Gonzalez R, Zhou H, et al. Detection of human bocavirus 3 in China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011;30,799-805.
27. Zhang DM, Ma MM, Wen WT, et al. Clinical epidemiology and molecular profiling of human bocavirus in faecal samples from children with diarrhoea in Guangzhou, China. *Epidemiol Infect* 2014;3:1-15.
28. Tymentsev A, Tikunov A, Zhirakovskaia E, et al. Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012. *Infect Genet Evol* 2016;37:143-9.
29. Lee EJ, Kim HS, Kim HS, et al. Human Bocavirus in Korean Children with Gastroenteritis and Respiratory Tract Infections. *BioMed Res Inter* 2016;5.
30. Netshikweta R, Chidamba L, Nadan S, Taylor MB, Page N. Molecular epidemiology of human bocavirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in South Africa, 2009-2015. *J Med Virol*. 2020;92:1124-1132.
31. Proenca-Modena JL, Martinez M, Amarilla AA, et al. Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiol Infect* 2013 ;141(12):2576-80.