

Akut gastroenteritli çocuklarda Human Bocavirus DNA varlığının araştırılması

Investigation of Human Bocavirus DNA in children with acute gastroenteritis

Serhat SİREKBASAN¹, Kenan MİDİLLİ¹, Yasemin AKIN², Pelin DEMİRCİ², Sevgi ERGİN¹, Arif KAYGUSUZ¹

ÖZET

Amaç: Akut gastroenteritler, çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra en sık morbidite ve mortalite nedenidir. Beş yaşın altındaki çocuklarda dünyada her yıl bir milyar çocuk ishale yakalanmakta ve yaklaşık altı milyon çocuk ishal nedeni ile kaybedilmektedir. Gastroenterit etkenlerinin bilinmesi, doğru tanı ve etkin tedavi fırsatı sağlamasının yanı sıra antimikrobiyal tedavi gereken durumlarda antibiyotik seçimi için de yol gösterici olmaktadır. Bu çalışmada, hastanemize başvuran 0-5 yaş arası çocuklardaki akut gastroenteritlerde Human Bocavirus varlığı ve sıklığının araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya, hastanemize başvuran akut gastroenteritli 0-5 yaş arasındaki 101 çocuktan (42 kız, 59 erkek) alınan dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Human Bocavirus (HBoV) DNA'sı NP-1 gen bölgesine uygun primer dizilerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: İncelenen 101 örnekten 7 (% 6,9)'si HBoV pozitif olarak saptanmıştır. HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 1,5 (1-2,5 yaş) olup %71,4'ü iki yaş altıdır. 7 pozitif örnekten de ikisinde (%28,6) birden fazla virus açısından (HBoV ve Norovirus) pozitiflik elde edilmiş ve eşzamanlı enfeksiyon varlığı düşünülmüştür.

ABSTRACT

Objective: Acute gastroenteritis is the second frequent reason of morbidity and mortality after lower respiratory tract infections. One billion children below the age of five have diarrhea every year throughout the world, and nearly six million children are lost due to diarrhea. Knowing gastroenteritis factors enables physicians to make accurate and efficient diagnoses, and guides them to select the right antibiotic when the cases require antimicrobial treatment. In this study, the purpose is to examine the existence and frequency of Human Bocavirus in acute gastroenteritis in children between 0-5 years of age applying to our hospital.

Methods: Stool samples taken from 101 children (42 female, 59 male) between the age of 0-5 with acute gastroenteritis were included in the study. The DNA of the Human Bocavirus (HBoV) was investigated with the PCR Method in which proper primary series were used for NP-1 gen area.

Results: Seven (6,9%) of the 101 samples that were examined in the scope of the study were determined to be HBoV positive. The mean age of the patients who were HBoV positive was 1,5 (1-2,5 years of age); and 71,4% were below the age of two. In two of the 7 positive samples (28,6%) positivity for more than more virus (HBoV and Norovirus) was determined, and simultaneous infection

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
²Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü



İletişim / Corresponding Author : Serhat SİREKBASAN

İstanbul Üni. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Fatih İstanbul - Türkiye
Tel : +90 537 509 77 55 E-posta / E-mail : serhat_tahres@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.01.2016
Kabul Tarihi / Accepted : 10.03.2017

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2017.59354

Sirekbasan S, Midilli K, Akın Y, Demirci P, Ersin S, Kaygusuz A. Akut gastroenteritli çocuklarda Human Bocavirus DNA varlığının araştırılması.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2017; 74(4): 261-268

Sonuç: HBoV'un gastrointestinal sistem enfeksiyonlarındaki rolünü araştırmak için düzenlenen çalışmalar tedavi ve epidemiyolojik açıdan önemlidir. HBoV'un akut gastroenterit enfeksiyonlarındaki rolünün tam olarak belirlenebilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Çalışmamızın ülkemizde bu konuda yapılan ilk araştırma olması açısından, epidemiyolojik çalışmalara katkısı olduğu kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: İnsan Bocavirusu, gastroenterit, çocuk, polimeraz zincir reaksiyonu, dışkı

was considered.

Conclusion: Studies conducted to investigate the role of HBoV in gastrointestinal system infections are important for treatment and epidemiological purposes. Further studies are required for the purpose of determining the role of HBoV in acute gastroenteritis infections. We believe that the present study of ours will contribute to the epidemiological studies since it is the very first research in this field.

Key Words: Human Bocavirus, gastroenteritis, child, polymerase chain reaction, stool

GİRİŞ

Tüm dünyada yaygın olarak görülen akut gastroenteritler özellikle küçük yaşta çocuklarda ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Günümüzde çocukluk çağında akut gastroenteritlere sebep olan etkenlerin çoğu virüslerdir. Bu viral enfeksiyonlar, tüm dünyadaki çocuk ölümlerinin önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelere bağlı olarak yeni tanımlanan bazı virüslerin gastroenteritle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (1, 2).

Human Bocavirüs (HBoV), ilk kez 2005 yılında Allander ve arkadaşları tarafından İsveç'te alt solunum yolu enfeksiyonu gözlenen çocukların klinik örneklerinden nonspesifik amplifikasyon yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan dizi ve filogenetik analizler sonucunda solunum yolu örneklerinden soyutlanan bu virüs Parvoviridae ailesi içinde sınıflandırılmıştır. Bovine parvovirüs ve Canine minute virüs adı verilen bu iki virüse yakın benzerlikler göstermesi nedeniyle Bocavirüs cinsine alınarak "Human Bocavirüs" adı verilmiştir (3).

HBoV ile ilgili yakın zamana kadar yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunlukla solunum yolu hastalarının solunum sekresyonlarından yapıldığı görülmektedir (4). Arnold ve arkadaşlarının (5) HBoV pozitif olan hastaların %16'sında ishal olduğunu ilk kez

bildirmesi ile birlikte benzer çalışmalar yapılmış ve HBoV'un gastroenteritli çocuklarda etken olabileceği sonucuna varılmıştır (6-10).

Bizde yapmış olduğumuz bu çalışmayla, hastanemize başvuran akut gastroenterit tanısı konulan çocuk hastaların dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile HBoV DNA varlığının araştırılmasını amaçladık. Ayrıca pozitif saptadığımız hasta örneklerinde viral koenfeksiyon varlığını araştırmak amacıyla diğer sık karşılaştığımız gastroenterit etkeni virüsleri de (Rotavirüs, Norovirüs, Astrovirüs, Adenovirüs serotip 40 ve 41) inceledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması

Ocak-Mayıs 2009 tarihleri arasında yürütülen bu çalışmada klinik olarak akut gastroenterit tanısı konulan beş yaş altında, 59 (%58,4)'u erkek, 42 (%41,6)'si kız olmak üzere toplam 101 çocuk hastaya ait dışkı örnekleri toplandı. Çalışmamızda Tıbbi Etik Kurul Yönergesine göre hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onayları alındı.

Dışkılar; hastanın steril numune kabına direkt dışkılaması ya da altbezlerinin naylon olan ters tarafından bağlatılarak sulu kısmın kaba aktarılması

ile sağlandı. Dışkılamakta zorlanan hastalardan rektal sürüntü örnekleri alınarak taşıma sıvısına aktarıldı ve en kısa sürede buz üzerinde laboratuvara iletildi. Örnekler laboratuvara ulaştığında vorteksenerek PCR yöntemiyle virüs genomu araştırılmak üzere - 80 °C'de saklandı.

Örneklerden Nükleik Asit Eldesi ve PCR İşlemi

Viral genom ekstraksiyonu High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche Diagnostics, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği talimatlara göre yapıldı. HBoV varlığı ORF bölgesinden kodlanan NS-1 gen bölgesine uygun primer dizileri kullanılarak tespit edildi (11).

1. Aşama 3' → 5' yönünde;

Bovo 1-2 F TAT GGC CAA GGC AAT CGT CCA AG

Bovo 1-2 R GCC GCG TGA ACA TGA GAA ACA GA

Yukarıdaki primerler kullanılarak thermal cyclerde 94 °C'de 3 dakikalık başlangıç siklusu sonrası amplifikasyon için 94 °C'de 60 saniye denatürasyon, 63 °C'de 60 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1,5 dakikalık uzama olmak üzere 45 siklus sonunda 72 °C'de 10 dakika ekstansiyon yaptırıldı. Çoğaltılan PCR ürünleri %1,5 oranında hazırlanan agaroz jelde görüntülendi.

HBoV DNA'sı saptadığımız hasta örneklerinde viral koenfeksiyon varlığını araştırmak amacıyla diğer sık karşılaştığımız gastroenterit etkeni virüsler de nested-PCR yöntemiyle incelendi. İlk önce araştırılacak olan

RNA'lı etkenlere (Rotavirüs, Norovirüs ve Astrovirüs) komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için revers transkripsiyon işlemleri gerçekleştirildi. DNA virüsü olan Adenovirüs serotip 40 ve 41 için ise bu işlem yapılmadı. Revers transkripsiyon PCR ve nested-PCR deneylerinde aynı thermal cyler cihazı (PTC-200, Peltier Thermal Cyler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı.

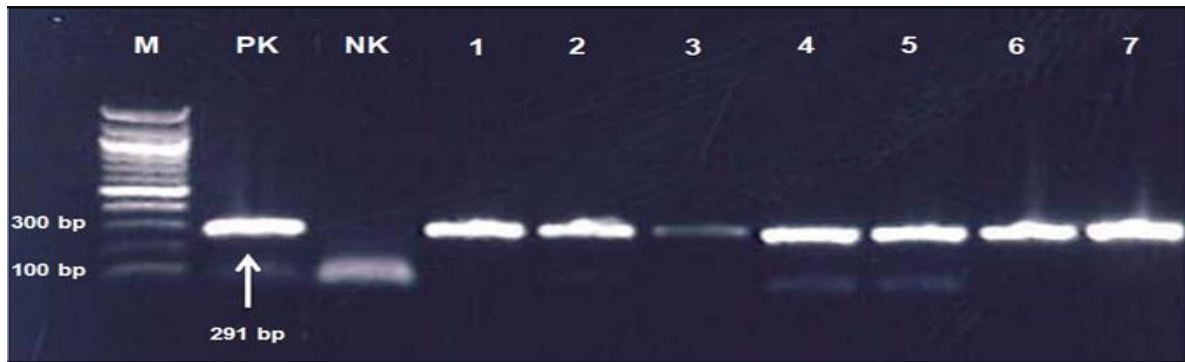
Pozitif olarak saptadığımız iki örneğe (3. ve 5. hasta) ait ilgili bantlar jelden kesilip pürifiye edildikten sonra amplikonun özgüllüğünü doğrulamak için DNA dizi analizine tabii tutuldu. Elde edilen diziler BLAST analizi ile değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

HBoV pozitifliğinin yaşlara ve cinsiyetlere göre dağılımı ki-kare testi ile değerlendirildi. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler SPSS 21,0 (İstanbul Üniversitesi'ne lisanslı) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

İncelenen 101 örnekten 7 (%6,9)'si HBoV pozitif olarak saptandı (Şekil 1). Pozitif saptanan örneklerin ikisinde de Norovirüs pozitifliği eşzamanlı olarak görüldü. HBoV pozitif hastaların hiçbirinde Rotavirüs, Astrovirüs, Adenovirüs serotip 40 ve 41 saptanmadı.



Şekil 1. HBoV pozitif PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA Ladder (100 bp); PK: Pozitif kontrol; NK: Negatif kontrol; 1, 2, 3, 4, 5, 6,7; pozitif örnekler).

Elde edilen DNA dizileri BLAST ile analiz edilerek HBoV sekansı ile örtüşme saptandığı gözlemlendi.

HBoV pozitif hastaların yaş ortalaması 1,5 (1-2,5 yaş) olup %71,4'ü 2 yaş altındaydı. Erkek çocukların 4'ü (%57,1) kız çocukların ise 3'ü pozitif olarak saptandı. Yaş dağılımına ve cinsiyete göre yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 1) ($p>0,05$).

Tablo 1. Demografik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı

	HBoV pozitif n: 7 (%)	HBoV negatif n: 94 (%)
Cinsiyet (erkek)	4 (57,1)	55 (58,5)
Cinsiyet (kız)	3 (42,9)	39 (41,5)
Yaş ortalaması (Std. sapma)	1,57 (0,73)	1,88 (1,21)
	Yaşların dağılımı	
0-2 yaş	5 (71,4)	67 (71,3)
2-5 yaş	2 (28,6)	27 (28,7)

HBoV izole edilen hastalarda en sık gözlenen semptomlar sırasıyla; ishal, kusma, ateş, bulantı, burun akıntısı, karın ağrısı, balgam çıkarma ve öksürük idi. Pozitif bulduğumuz yedi çocuk hastanın hepsine klinik olarak akut gastroenterit, bir tanesine ise ek olarak üst solunum yolu enfeksiyonu tanısı konmuştu (Tablo 2).

Tablo 2. Klinik özelliklerine göre 101 hastanın dağılımı

	HBoV pozitif n:7 (%)	HBoV negatif n:94 (%)
İshal	7 (100)	94 (100)
Kusma	6 (85,7)	83 (88,3)
Ateş	5 (71,4)	43 (45,7)
Bulantı	3 (42,9)	21 (22,3)
Burun akıntısı	2 (28,6)	27 (28,7)
Balgam çıkarma	1 (14,3)	9 (9,6)
Karın ağrısı	1 (14,3)	12 (12,8)
Öksürük	1 (14,3)	31 (33)
Boğaz ağrısı	0	4 (4,3)
Hırıltı	0	11 (11,7)

TARTIŞMA

Günümüzde çocukluk çağında akut gastroenteritlere sebep olan etkenlerin çoğu virüslerdir. Bu viral enfeksiyonlar, tüm dünyadaki çocuk ölümlerinin “önemli bir bölümünü teşkil etmektedir. Son yıllarda moleküler tanı yöntemlerindeki hızlı gelişmeler, geleneksel tanı yöntemleri ile saptanamayan yeni viral etkenlerin varlığını bize göstermiştir (1, 2).

HBoV, ilk kez 2005 yılında alt solunum yolu enfeksiyonu gözlenen çocukların klinik örneklerinden izole edilmiştir (3). 2007 yılından bu yana yapılan çalışmalarda gastrointestinal semptomlar gösteren çocukların dışkı örneklerinde yaygın olarak pozitiflik saptanması, bu virüsün gastroenterite yol açtığı fikrinin ortaya atılmasını sağlamıştır.

Ülkemizden HBoV ile ilgili, solunum yolu enfeksiyonu olan olgularda araştırma yapan birçok çalışma ve postmortem bir olgu sunumu bulunmaktadır (11-14). Araştırdığımız kadarıyla Türkiye’de akut gastroenterit olgularıyla ilgili Mitui ve ark.’nın yapmış olduğu bir çalışmaya rastlanılmıştır (15).

Vicente ve ark.’nın İspanya’da yaptıkları çalışma sonucu ilk kez akut gastroenteritli çocukların dışkı örneklerinde HBoV pozitifliği bildirilmiştir ve 527 hastada 48 (%9,1) HBoV saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada, pozitiflik oranının yüksek bulunması akut gastroenterit olgularında etken olabileceğini düşündürmüştür (6). Yapılan çalışmalara bakıldığında HBoV enfeksiyonunun tüm dünyada saptandığı görülmektedir (Tablo 3) (16-22).

Mitui ve ark. beş yaş altındaki akut ishalleri çocuklarda yaptıkları çalışmada, Bangladeş’ten 138 ve Türkiye’den 150 olmak üzere toplam 288 dışkı örneğini incelemiş; HBoV pozitifliğini sırasıyla 87 (%63) ve 13 (%8,7) olarak bulmuşlardır (15).

Cheng ve ark.’nın Çin’de, akut gastroenteritli 397 ve sağlıklı 115 çocuk üzerinde yaptıkları kontrollü çalışmada, semptomları olan çocukların 14 (%3,5)’ünde, sağlıklı olan çocukların ise 4 (%3,5)’ünde HBoV pozitifliği bildirilmiştir (23).

Tablo 2. Dünyada HBoV'ye ait veriler

Çalışan	Kaynak no	Yer	Yayın tarihi	Hasta sayısı	Pozitiflik
Albuquerque ve ark.	16	Brezilya	2007	705	2%
Lau ve ark.	9	Hong Kong	2007	1435	2.1%
Lee ve ark.	17	Kore	2007	962	0.8%
Vicente ve ark.	6	İspanya	2007	527	9.1%
Campe ve ark.	18	Almanya	2008	307	4.6%
Szomor ve ark.	19	Macaristan	2009	61	3.3%
Khamrin ve ark.	20	Tayland	2011	222	7.7%
Romani ve ark.	21	İran	2013	294	9.18%
Mitui ve ark.	15	Türkiye	2014	150	8.7%
La Rosa ve ark.	22	Arnavutluk	2015	142	9.1%
Bu çalışmada		Türkiye		101	6.9%

Yaptığımız bu çalışmada 101 çocuk hastanın 7 (%6,9)'sini pozitif olarak saptadık. Bu oran dünya verilerinin takribi bir ortalamasını yansıtmaktadır.

Ülkemizde, klinik örneklerde HBoV DNA varlığı ile ilgili makaleler oldukça sınırlı sayıdadır. Araştırdığımız kadarıyla tiplendirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamış bulunmamaktayız. Bizim çalışmamızda da kullandığımız primerler saptama için tasarlanmış olup, tiplendirme için uygun değillerdi. Bu nedenle pozitif olarak saptadığımız iki örneğe ait ilgili bantlar jelden kesilip pürifiye edildikten sonra amplikonun özgüllüğünü doğrulamak için DNA

dizi analizine tabii tutuldu. Elde edilen DNA dizileri BLAST ile analiz edilerek HBoV sekansı ile örtüşme saptandığı gözlemlendi. Böylelikle amplikonun özgüllüğü doğrulanmış oldu.

HBoV enfeksiyonlarının kliniği konusundaki veriler hala oldukça sınırlıdır. Lee ve ark.'nın Kore'de beş yaş altındaki çocuklarda yaptıkları çalışmada, akut gastroenterit nedeniyle hastaneye yatırılan 962 hastanın sekizinde (%0,8) HBoV pozitifliği bulunmuştur. HBoV pozitif sekiz hastanın tamamında ishal bulunurken, beşinde ateş, üçünde kusma, ikisinde öksürük tespit edilmiştir (17).

Yu ve ark.'nın yaptığı çalışmada 67 HBoV pozitif hastanın tamamında ishal tespit edilmiştir. Diğer semptomlar arasında en sık kusma (%73) ve ateş (%52) görülmektedir (24).

Cheng ve arkadaşlarının çalışmasında bulunan 14 HBoV pozitif hastanın yedisinde ateş, 11'inde de kusma belirtileri tespit edilmiştir (23).

Bizim çalışmamızda HBoV pozitif bulduğumuz 7 çocuk hastanın tamamına akut gastroenterit enfeksiyonu, buna ek olarak bir hastada da üst solunum yolu enfeksiyonu tanısı konmuştur. HBoV pozitif çocuklarda öne çıkan semptomlar sırasıyla; ishal (%100), kusma (%85,7), ateş (%71,4), bulantı (%42,9), burun akıntısı (%28,6), karın ağrısı (%14,3),

balgam çıkarma (%14,3) ve öksürük (%14,3) olmuştur. Dünyada bildirilen verilere bakıldığında buna benzer bilgilere rastlanmıştır.

HBoV'un gastrointestinal sistem enfeksiyonlarındaki rolüne yönelik yapılan çalışmalar tedavi ve epidemiyolojik açıdan çok önemlidir. Daha önce solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda saptanmış bu virüsün, gastrointestinal sistem enfeksiyonlarındaki yeri ülkemizde bilinmemektedir. Bu nedenle yakın zamanda tanımlanan bu virüsün ülkemizde çocukluk çağı gastroenteritlerindeki rolünü belirlemek amacıyla ileriye dönük moleküler, klinik ve seroepidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 3728). Bu çalışma ilk yazarın, yüksek lisans tezinden yazılmış olup, Uluslararası Katılımlı 4. Ulusal Viroloji Kongresi'nde (23-26 Haziran 2011, İstanbul, Türkiye) poster olarak sunulmuştur.

REFERENCES

1. Albayrak N, Yağcı-Çağlayık D, Altaş AB, Korukluoğlu G, Ertek M. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(1): 9-15.
2. Akhter S, Türegün B, Kıyan M, Gerçek D, Güriz H, Şahin F. Beş yaş altı çocuklarda gastroenterite neden olan yedi farklı RNA virusunun araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2014; 48(2): 233-41.
3. 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 USA*. 2005; 102(36): 12891-6.
4. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol*, 2008; 41(1): 29-33.
5. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis*, 2006; 43(3): 283-8.
6. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13(4): 636-7.
7. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*, 2007; 45(7): 2116-22.
8. 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(9): 1276-82.
9. Lau SKP, Yip CC, Que TL, Lee RA, Au-Yeung RK, 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(7): 986-93.
10. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*, 2006; 78(9): 1232-40.
11. Midilli K, Yılmaz G, Türkoğlu S, Iskanova B, Ergin S, Yarımcam F ve ark. Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve erişkinlerde insan bokavirus DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Mikrobiyol Bul*, 2010; 44: 405-13.
12. Ziyade N, Şirin G, Elgörmüş N, Daş T. Detection of human bocavirus DNA by multiplex PCR analysis: postmortem case report. *Balkan Med J*, 2015; 32(2): 226-9.
13. Yeşilbaş O, Kızırtı HS, Talip Petmezci M, Balkaya S, Hatipoğlu N, Meşe S, et al. Very rare and life-threatening complications of bocavirus bronchiolitis: pneumomediastinum and bilateral pneumothorax. *Mikrobiyol Bul*, 2016; 50(1): 159-64.
14. Aktürk H, Sütçü M, Badur S, Törün SH, Çıtak A, Erol OB, et al. Evaluation of epidemiological and clinical features of influenza and other respiratory viruses. *Türk Pediatri Ars*, 2015; 50(4): 217-25.
15. Mitui MT, Bozdayı G, Ahmed S, Matsumoto T, Nishizono A, Ahmed K. 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; 86(7): 1159-68.
16. 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(11): 1756-8.
17. 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(7): 994-7.

18. Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of human bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Virol*, 2008; 43(3): 340-2.
19. Szomor KN, Kapusinszky B, Rigo Z, Kis Z, Rozsa M, Farkas A, et al. Detection of human bocavirus from fecal samples of Hungarian children with acute gastroenteritis. *Intervirology*, 2009; 52(1): 17-21.
20. Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Okitsu S, et al. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*, 2012; 12(3): 565-9.
21. Romani S, Mohebbi SR, Khanyaghma M, Azimzadeh P, Bozorgi SM, Damavand B, et al. Detection of human bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2013; 6(Suppl 1): 77-81.
22. La Rosa G, Della Libera S, Iaconelli M, Donia D, Cenko F, Xhelilaj G, et al. Human bocavirus in children with acutegastroenteritis in Albania. *J Med Virol*, 2016; 88(5): 906-10.
23. 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(2): 161-7.
24. Yu JM, Li DD, Xu ZQ, Cheng WX, Zhang Q, Li HY, Cui SX, et al. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *J Clin Virol*, 2008; 42(3): 280-5.