

Epidemiološka i klinička obilježja infekcija dišnog sustava dječje dobi s dokazanim humanim bokavirusom

Mijač, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:500691>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Mijač

**Epidemiološka i klinička obilježja
infekcija dišnog sustava dječje dobi s
dokazanim humanim bokavirusom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Mijač

**Epidemiološka i klinička obilježja
infekcija dišnog sustava dječje dobi s
dokazanim humanim bokavirusom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu u okviru istraživačkog projekta HRZZ RESPIVIRUS IP-2016-06-7556: „Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika“ (od engl. „*New and neglected respiratory viruses in vulnerable groups of patients*“), voditeljice prof. dr. sc. Sunčanice Ljubin Sternak.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sunčanica Ljubin Sternak

Zahvala

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sunčanici Ljubin Sternak, bez čijeg znanja, strpljenja i neizmjerne podrške ne bi bilo ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jasmini Vraneš na ukazanom povjerenju, ali i kreiranju pozitivne i poticajne radne atmosfere u kojoj je moguće rasti.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ireni Ivković-Jureković iz Klinike za dječje bolesti Zagreb i doktorici Tatjani Tot iz Opće bolnice Karlovac na njihovoj susretljivosti i pomoći prilikom prikupljanja uzoraka i podataka.

Zahvaljujem dragim inženjerkama Matei Kvaternik Celjak i Suzani Ćesić na visokoj razini stručnosti i pomoći prilikom tehničkog izvođenja istraživanja.

Zahvaljujem kolegama Anamariji Slović, Dubravku Forčiću i Mirni Jurković na pomoći pri genotipizaciji sojeva.

Hvala dragim kolegicama i kolegama iz Službe za kliničku mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ na svakodnevnoj podršci i razumijevanju, osobito tijekom pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem svojoj obitelji na njihovoj podršci i ljubavi kojom ispunjavaju moj život.

I na koncu, zahvalna sam dragom Bogu i Čudotvornoj Gospi Sinjskoj bez čije pomoći ne bi bilo ovog rada.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Humani bokavirus	1
1.1.1. Uvod	1
1.1.2. Taksonomija i klasifikacija	1
1.1.3. Građa i genom virusa	4
1.1.4. Replikacija i stanični ciklus virusa	7
1.1.5. Patogeneza i imunološki odgovor	11
1.1.6. Epidemiologija	14
1.1.7. Kliničke značajke	17
1.1.8. Dijagnostika	18
1.1.9. Liječenje i prevencija	22
1.2. Svrha rada.....	23
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI RADA	25
3.1. Opći cilj.....	25
3.2. Specifični ciljevi.....	25
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1. Ispitanici i uzorci.....	26
4.2. Etička odobrenja.....	26
4.3. Metode virološke dijagnostike infekcije humanim bokavirusom	26
4.4. Kliničko-laboratorijski podaci.....	40
4.5. Statistička obrada	40
5. REZULTATI.....	42
5.1. Ispitanici.....	42
5.2. Rezultati multipleks PCR-a na 15 respiratornih virusa	42
5.3. Rezultati kvantitativnog PCR-a na HBoV.....	59
5.4. MT-PCR analiza uzoraka u kojima je detektirano više od jednog virusa	69
5.5. Rezultati genotipizacije HBoV.....	75
6. RASPRAVA	80
7. ZAKLJUČCI.....	94
8. SAŽETAK.....	96
9. SUMMARY	98

10. LITERATURA.....	99
11. ŽIVOTOPIS	111

Popis kratica

AAV	adeno-pridruženi virus (od engl. <i>adeno-associated virus</i>)
AdV	adenovirus
AOM	akutna upala srednjeg uha (od engl. <i>acute otitis media</i>)
ARDS	akutni respiratorni distress sindrom
ARI	akutne respiratorne infekcije
BPV	goveđi parvovirus (od engl. <i>bovine parvovirus</i>)
CPV	pseći parvovirus (od engl. <i>canine parvovirus</i>)
DDR	stanični odgovor na oštećenje DNA (od engl. <i>DNA damage response</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNAza	deoksiribonukleaza
EGF	epidermalni čimbenik rasta (od engl. <i>epidermal growth factor</i>)
Flu A	virus influence A
Flu B	virus influence B
HAE-ALI	kultura stanica dobivena od stanica ljudskog dišnog epitela uzgajana u struji kisika (od engl. <i>human airway epithelium-air liquid interface</i>)
HBoV	humani bokavirus
HCoV 229E	humani koronavirus 229E
HCoV OC43	humani koronavirus OC43
HEV	humani enterovirus
HMPV	humani metapneumovirus
HRV	humani rinovirus
HRZZ	Hrvatska zaklada za znanost
ICTV	Međunarodni odbor za taksonomiju virusa (od engl. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IDDS	infekcija donjeg dišnog sustava
IGDS	infekcija gornjeg dišnog sustava

IKK α	I kapa kinaza alfa (od engl. <i>I kappa kinase alpha</i>)
IKK β	I kapa kinaza beta (od engl. <i>I kappa kinase beta</i>)
IL-18	interleukin 18
IL-1 β	interleukin 1 β
IQR	interkvartilni raspon
KDB Zagreb	Klinika za dječje bolesti Zagreb
KRV	Kilhamov štakorski virus (od engl. <i>Kilham rat virus</i>)
LEH	lijevostrano usmjerena DNA struktura oblika ukosnice (od engl. <i>left handed hairpin</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. <i>messenger RNA</i>)
MT-PCR	multipleks tandem PCR
MVM	parvovirus glodavaca (od engl. <i>minute virus of mice</i>)
NF- κ B	jezgrin čimbenik kappa B (od engl. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NGS	sekvenconiranje nove generacije (od engl. <i>next generation sequencing</i>)
NRLP3	komponenta urođene imunosti (od engl. <i>NOD-like receptor pyrin domain containing protein</i>)
OB Karlovac	Opća bolnica Karlovac
OBD/DBD	DNA vezujuća domena (od engl. <i>origin binding domain / DNA binding domain</i>)
ORF	otvoreni okvir čitanja (od engl. <i>open reading frame</i>)
Ori	ishodište replikacije (od engl. <i>replication origin</i>)
PARDS	pedijatrijski akutni respiratorni distress sindrom
Parvo B19	parvovirus B19
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCT	prokalcitonin
PI3KK	fosfatidiliinozitol-3-kinaza-povezane kinaze
PiV 1-4	virus parainfluence 1-4
PKC	fosfokinaza C
PLA2	fosfolipaza A2
Pol III	virusna polimeraza III

POC test	testiranje na mjestu pružanja skrbi (od engl. <i>point-of-care</i>)
PPV	pozitivna prediktivna vrijednost
pre-mRNA	prekursorska mRNA
PRR	receptor za prepoznavanje molekularnih obrazaca (od engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
qPCR	kvantitativni PCR
REH	desnostrano usmjerena DNA struktura oblika ukosnice (od engl. <i>right handed hairpin</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina
RSV A	respiratorni sincicijski virus A
RSV B	respiratorni sincicijski virus B
SaO ₂	saturacija arterijske krvi kisikom
SIRS	sistemiški upalni odgovor (od engl. <i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
ssDNA	jednolančana DNA (od engl. <i>single stranded DNA</i>)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteaza (od engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze alfa (od engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TNF- β	čimbenik tumorske nekroze beta (od engl. <i>tumor necrosis factor beta</i>)
TRAF2	čimbenik pridružen receptoru za TNF (od engl. <i>TNF receptor associated factor 2</i>)
UTM	univerzalni transportni medij (od engl. <i>universal transport medium</i>)
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (od engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLP	virusu slične čestice (od engl. <i>virus-like particles</i>)
WPC	kontrola cijelog procesa (od engl. <i>whole process control</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Humani bokavirus

1.1.1. Uvod

Humani bokavirus (HBoV) otkrila je skupina istraživača na čelu s Thomasom Alanderom 2005. godine u Švedskoj u uzorcima aspirata nazofarinksa u djece oboljele od akutne respiratorne bolesti. To je prvi virus koji je identificiran metodom molekularnog probira, procedurom koja se temelji na nasumičnoj amplifikaciji nukleinskih kiselina u uzorku te sekvenciranjem i bioinformatičkom analizom dobivenih produkata. Na taj način je otkrivena nova, do tada nepoznata sekvenca virusa koja nije pripadala niti jednom do tada poznatom virusnom ili bakterijskom patogenu (1,2). Daljnjom analizom utvrđeno je da novootkriveni virus dijeli sekvencu s dva životinjska parvovirusa, goveđim (BPV, od engl. *bovine parvovirus*) i psećim parvovirusom (CPV, od engl. *canine parvovirus*) iz roda *Bocaparvovirus* te je novootkriveni virus nazvan humani bokavirus, a kasnije označen kao humani bokavirus 1 (HBoV 1) (3). Kasnija istraživanja 2009. i 2010. godine otkrila su još tri dodatna tipa humanog bokavirusa, HBoV 2-4, koji su pronađeni u uzorcima stolice (4,5).

Među humanim parvovirusima najpoznatiji je parvovirus B19 (parvo B19), iz roda *Erythroparvovirus*, koji uzrokuje *erythema infectiosum* ili petu osipnu bolest te druge bolesti (artritis, fetalni hidrops, prolaznu aplastičnu krizu) kod djece i odraslih. Premda su filogenetski vrlo srodni, HBoV i parvo B19 razlikuju se po svojim biološkim karakteristikama – tropizmu, načinu perzistencije, patogenezi i kliničkoj prezentaciji (6).

1.1.2. Taksonomija i klasifikacija

Parvovirusi su skupina raznolikih malih DNA virusa koji inficiraju široku paletu domaćina, a većina je otkrivena u drugoj polovini 20. stoljeća. Prvi virus iz ove skupine izoliran je 1959. godine iz štakora te je nazvan Kilhamov štakorski virus (KRV, od engl. *Kilham rat virus*) (7). U razdoblju od 1960. do 1962. godine u kulturama stanica s adenovirusom, elektronskim mikroskopom su uočene male čestice koje su bile ovisne o replikaciji adenovirusa ili herpes virusa te su nazvane adeno-pridruženi virus (AAV, od engl. *adeno-associated virus*). Za čovjeka najznačajniji predstavnik ove skupine virusa otkriven je 1974. godine, humani parvovirus B19, koji je identificiran tijekom analize uzoraka krvi asimptomatskih donora

testiranih na virus hepatitisa B, a ime mu je izvedeno od koda uzorka u kojemu je otkriven. Tek nekoliko godina kasnije parvo B19 povezan je s prolaznim aplastičnim krizama u bolesnika s anemijom srpastih stanica (8), a nešto kasnije i s petom osipnom bolesti kod djece te postinfektivnim artralgijsama (9,10). Godine 1978. otkriven je parvovirus patogen za pse, (CPV, od engl. *canine parvovirus*), a zatim su otkriveni i brojni drugi srodni virusi koji su uglavnom izolirani iz životinja ili staničnih kultura (11). Otkrićem molekularnih metoda, a naročito primjenom metoda sekvenciranja, otkriveni su brojni drugi parvovirusi od kojih neki, osobito u rodu *Bocaparvovirus*, još nisu uzgojeni na staničnim kulturama. Virusi unutar obitelji *Parvoviridae* razvrstani su 1993. godine prema domaćinu kojeg inficiraju u dvije podobitelji: *Parvovirinae*, u koju su svrstani virusi koji inficiraju kralježnjake, te *Densovirinae*, u koju su klasificirani virusi koji inficiraju beskralježnjake (12). Ova jednostavna podjela, temeljena na kriteriju domaćina, nedavno je nadopunjena i promijenjena otkrićem novih divergentnih virusa te je u klasifikaciju dodana i treća podobitelj *Hamaparvovirinae* s uključenih pet rodova i 21 vrstom.

Obitelj	Podobitelj	Rod	Vrsta	Ime virusa
Parvoviridae	<i>Densovirinae</i> (11 rodova, 21 vrsta)	<i>Amdoparvovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 1	
	<i>Hamaparvovirinae</i> (5 rodova, 21 vrsta)	<i>Artiparvovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 2	
	Parvovirinae	<i>Aveparvovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 3	
		<i>Bocaparvovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 4	
		<i>Copiparvovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 5	
		<i>Dependovirus</i>	Carnivore bocaparvovirus 6	
		<i>Erythroparvovirus</i>	Chiropteran bocaparvovirus 1	
		<i>Loriparvovirus</i>	Chiropteran bocaparvovirus 2	
		<i>Protaparvovirus</i>	Chiropteran bocaparvovirus 3	
		<i>Tetraparvovirus</i>	Chiropteran bocaparvovirus 4	
			Chiropteran bocaparvovirus 5	
			Lagomorph bocaparvovirus 1	
			Pinniped bocaparvovirus 1	
			Pinniped bocaparvovirus 2	Humani bokavirus 1
			Primate bocaparvovirus 1	Humani bokavirus 3
			Primate bocaparvovirus 2	Humani bokavirus 2
			Primate bocaparvovirus 3	Humani bokavirus 4
			Rodent bocaparvovirus 1	
			Rodent bocaparvovirus 2	
			Ungulate bocaparvovirus 1	
			Ungulate bocaparvovirus 2	
			Ungulate bocaparvovirus 3	
			Ungulate bocaparvovirus 4	
			Ungulate bocaparvovirus 5	
			Ungulate bocaparvovirus 6	
			Ungulate bocaparvovirus 7	
			Ungulate bocaparvovirus 8	
			Ungulate bocaparvovirus 9	

Slika 1. Taksonomska klasifikacija roda *Bocaparvovirus*, prilagođeno prema klasifikaciji Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa, ICTV (od engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (16)

Humani parvovirusi trenutno se nalaze u pet različitih rodova: *Erythroparvovirus* (parvo B19), *Dependoparvovirus* (AAV), *Tetraparvovirus* (PARV4, parvovirus 4), *Bocaparvovirus* (HBoV

1-4) i *Protovirus* (BuV, bufavirus; TuV, tusavirus; CuV, cutavirus). Parvovirus B19 i AAV su otkriveni slučajno, metodama klasične virologije, dok su novootkriveni parvovirusi otkriveni aktivnim traganjem metodama molekularne mikrobiologije i virusne metagenomike. AAV se trenutno smatra apatogenim te se zbog svojih molekularnih karakteristika pokazao kao idealni vektor za razvoj genske terapije (13). PARV4 je otkriven 2005. godine u krvi intravenskog ovisnika zaraženog virusom hepatitisa B, u sklopu istraživanja rizičnih čimbenika za HIV i akutnog virusnog sindroma, a trenutno nije poznata njegova moguća patogena uloga (14). Virusi iz roda *Protovirus* su otkriveni metodama sekvenciranja nove generacije (NGS, od engl. *next generation sequencing*) i metagenomike u humanim fekalnim uzorcima u razdoblju od 2012. do 2016. godine, ali još nisu definitivno povezani s bolestima kod čovjeka (15). Pregled do sada otkrivenih humanih parvovirusa prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Pregled do sada otkrivenih humanih parvovirusa, prilagođeno prema Söderlund-Venermo (18)

Parvovirus	Godina otkrića i uzorak u kojem je otkriven	Metoda kojom je virus otkriven	Bolest
AAV, mnogo serotipova	1965. kontaminanta staničnih kultura	Slučajno otkriće Elektronska mikroskopija	Ne izaziva bolest?
Parvo B19, 3 genotipa	1975. Serum	Slučajno otkriće Lažno pozitivni test na HBV	Osip, artritis, anemija, fetalni hidrops, smrt (encefalitis, hepatitis)
PARV4, 3 genotipa	2005. krvna plazma	Aktivno traganje NGS	Nepoznato (encefalitis?)
HBoV 1	2005. nazofaringealni aspirat	Aktivno traganje NGS	IRT, AOM, (encefalitis hepatitis?)
HBoV 2-4	2009.-2010. stolica	Aktivno traganje NGS	Nepoznato AGE?
BuV, 3 genotipa	2012. stolica	Aktivno traganje NGS	Nepoznato AGE?
TuV	2014. stolica	Aktivno traganje NGS	Nepoznato (dvojbeno je li humani virus?)
CuV	2014. Stolica i uzorci kože CTCL	Aktivno traganje NGS	Nepoznato (CTCL?)

AAV, adeno-pridruženi virus; AGE, akutni gastroenteritis; AOM, akutni otitis media; parvo B19, parvovirus B19; BuV, bufavirus; CTCL, kutani T stanični limfom; CuV, cutavirus; HBoV, humani bokavirus; HBV, virus hepatitisa B; IRT, infekcija respiratornog trakta; NGS, sekvenciranje nove generacije; PARV4, parvovirus 4; TuV, tusavirus

Virusi u rodu *Bocaparvovirus* potječu od istog pretka (od engl. *monophyletic*) i većina dijeli više od 30% NS1 aminokiselinskog slijeda, što je trenutno glavni taksonomski kriterij za podjelu virusa unutar obitelji *Parvoviridae*. Prema trenutnoj ICTV klasifikaciji HBoV 1 pripada u rod *Bocaparvovirus*, vrstu *Bocaparvovirus primata 1* (od engl. *Primate bocaparvovirus 1*) (16) u kojem se nalazi i HBoV 3, dok su HBoV 2 i HBoV 4 svrstani u vrstu *Bocaparvovirus primata 2* (od engl. *Primate bocaparvovirus 2*) (17) (slika 1). Dakle, trenutna taksonomija HBoV, koja je bazirana na kriteriju aminokiselinskog slijeda NS1 proteina, može izazivati konfuziju; naime u literaturi se često govori o četiri genotipa jednog virusa, dok se zapravo radi o dvije vrste virusa, svaka s po dva genotipa. Međutim, ta podjela ne slijedi kliničke razlike među ovim virusima, gdje je HBoV 1 primarno respiratorni, a ostala tri virusa su crijevni patogeni (18).

1.1.3. Građa i genom virusa

Parvovirusi su mali neovijeni virusi ikozaedarske strukture. Genom okružuje mala (oko 25 nm promjera) i strukturno stabilna kapsida koja se veže na stanice domaćina, a nosi mali genom sa nekoliko gena koji kontroliraju interakciju virusa sa domaćinom (11). Genom je sačinjen od jedne linearne jednolančane DNA (ssDNA) s oko 5000 baza te su kao takvi potpuno ovisni o staničnoj funkciji. Zbog tako malog genoma parvoviruse se dijeli na dvije skupine: autonomne (kao što je parvo B19) te one koji trebaju pomoć drugog virusa za replikaciju, kao što je to slučaj AAV, te se donedavno smatralo da se mogu replicirati samo u stanicama koje se dijele (18). Zbog poteškoća u uzgoju HBoV u *in vitro* uvjetima, molekularne karakteristike ovog virusa su dugo bile nepoznate. Jedini *in vitro* sistem u kojem je HBoV 1 sposoban izazvati infekciju je HAE-ALI, kultura diferenciranih (mitotski neaktivnih) epitelnih stanica humanog dišnog epitela (HAE; od engl. *human airway epithel*), kultiviranih u visokom protoku kisika (ALI; od engl. *air-liquid interface*). Infekcija se ne može proizvesti u drugim staničnim kulturama koje su nastale iz dišnog epitela koji se dijele. Drugi stanični sustav koji podržava replikaciju virusa je stanična linija izvedena iz ljudskih embrionalnih stanica bubrega (od engl. *human embryonic kidney* 293, HEK293) koja podržava replikaciju i proizvodnju infektivnih viriona, ali nakon transfekcije pIHBoV1 plazmida koji nosi dvostruku virusnu DNA pune duljine (19).

Genom parvovirusa je pakiran u T=1 ikozaedarsku kapsidu koja je sastavljena od 60 kopija kapsidnih proteina (VP1 do VP6), koji dijele C-terminalni dio. VP1 je uvijek manja komponenta, tipično čineći oko pet kopija po kapsidi, dok je najmanji VP protein uvijek glavna

komponenta. HBoV 1 ekspirira tri kapsidna proteina VP1, VP2 i VP3 u omjeru 1:1:10. VP3 je abundantni protein koji može stvoriti virusu slične čestice (VLP; od engl. *virus-like particles*) koji sadrže neutralizirajuće epitope i receptorska vezna mjesta (20). Jedinstveni N-terminalni kraj VP1 (VP1u) sadrži konzervirani motiv fosfolipaze A2 (PLA2) unutar prvih 131 aminokiselina te je ključan za infekciju (21). Istraživanja topologije kapside HBoV su pokazala da HBoV dijeli većinu značajki površine kapsida s druga dva ljudska parvovirusa (parvo B19 i AAV2) te proteini kapside vjerojatno sudjeluju u vezanju virusa na stanični receptor. Također je pokazano da kapsida HBoV mora proći konformacijske promjene slično kao kapsida AAV2 tijekom unutarstaničnog prijenosa (19). Detalji infekcije stanica parvovirusima još uvijek nisu u potpunosti shvaćeni, ali procesi moraju uključivati male promjene u strukturi kapsida koje omogućuju virusima da pobjegnu iz endosoma, prođu kroz citoplazmu stanica i dostave genom u jezgru, gdje se odvija replikacija virusa.

Među humanim bokavirusima, potpuno je sekvenciran genom HBoV 1, uključujući i terminalne krajeve genoma (22). Virusni genom čini negativno usmjerena jednolančana DNA (ssDNA) koja se sastoji od 5,543 nukleotidna slijeda (Genbank accession no.: JQ923422) sa različitim strukturama na lijevom (LEH; od engl. *left-end hairpin*) i desnom kraju (REH; od engl. *right-end hairpin*). LEH ima oblik y, a REH ima pravilnu palindromsku strukturu jedinstvenu među svim parvovirusima (23). Transkripcijski profil (slika 2) obuhvaća samo jedno promotorsko mjesto, što znači da se prepisuje jedna prekursorska mRNA (pre-mRNA) koja se onda alternativnim razrezivanjem (engl. *splicing*) i poliadenilacijom prekraja u više mRNA (24).

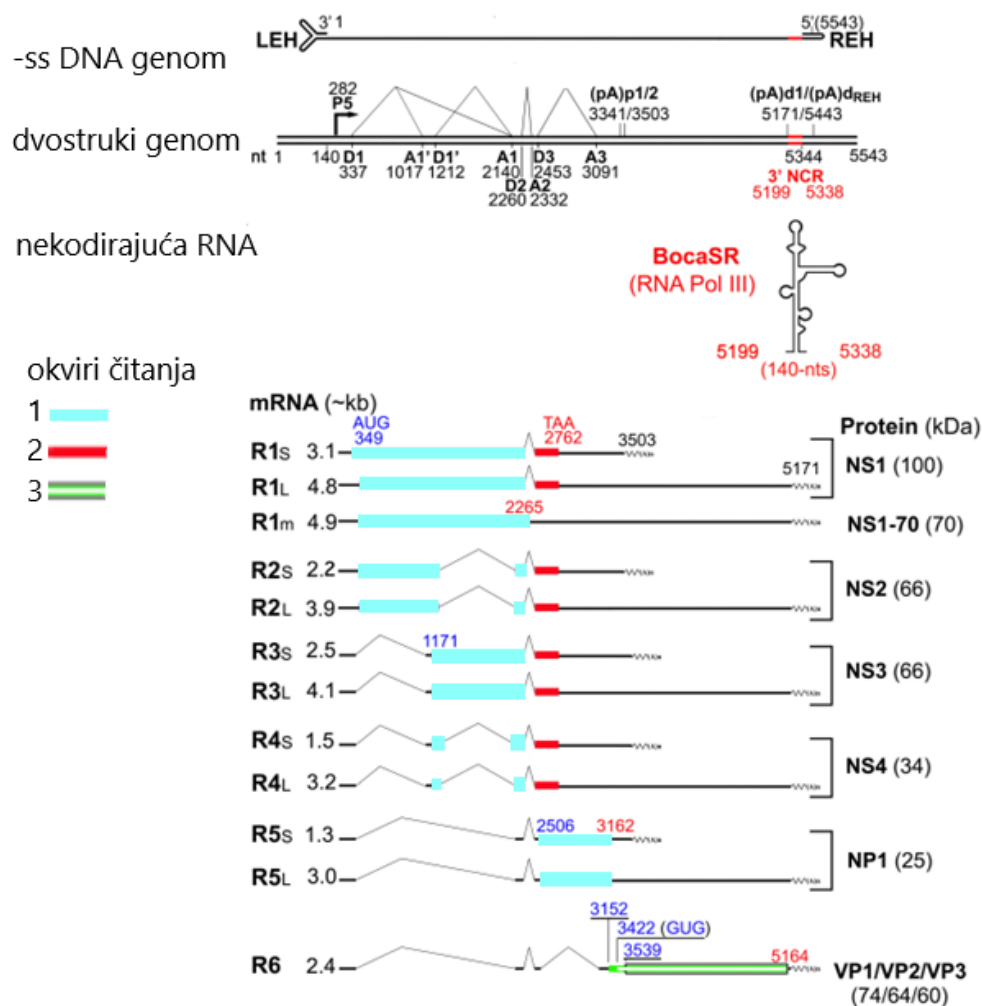
Lijeva strana genoma kodira šest nestrukturnih proteina NS1, NS1-70, NS2, NS3, NS4 i NP1. NS1 je ključan za replikaciju virusne DNA (25). Sekvencijska sličnost NS1 proteina između BPV-a i HBoV 1, te MVM-a (MVM; od engl. *minute virus of mice*) i HBoV 1 iznose 31% i 39% (23). Istraživanja su pokazala da se ovaj protein sastoji od tri funkcionalne domene: N-terminalne DNA-vezujuće/endonukleazne domene, srednje helikazne domene i C-terminalne domene za aktivaciju transkripcije. N-terminalna domena se veže na ishodište replikacije (Ori; od engl. *replication origin*) koje se još naziva i DNA vezujuća domena (OBD/DBD, od engl. *origin binding domain / DNA binding domain*). Najbolje je proučena interakcija između NS1 OBD i Ori kod AAV virusa. Mutacija u području OBD regije HBoV 1 značajno umanjuje virusnu replikaciju, iako sam HBoV 1 OBD/Ori kompleks još nije strukturalno određen (26). Na modelu MVM virusa je pokazano da su za replikaciju potrebni i dodatni stanični proteini kao

što je fosfokinaza C (PKC) koji omogućavaju NS1 proteinu da iskaže svoju helikaznu aktivnost.

Za NS2 se zna da igra ulogu u dobro diferenciranim stanicama dišnog epitela (HAE-ALI), ali nije potreban za replikaciju u HEK293. Uloga NS3 i NS4 nije još istražena (27).

HBoV 1 posjeduje i posebni nestrukturani protein NP1. Njegov okvir čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*) se poklapa sa C1 krajem ORF-a za NS1, ali se radi o drugačijem okviru čitanja. Ovaj protein igra ulogu ne samo u replikaciji DNA, već i u procesiranju virusnih mRNA transkripata esencijalnih za sintezu kapsidnih proteina (28, 29).

Osim ovih proteina, virus također eksprimira malu nekodirajuću RNA, BocaSR. To je prva identificirana virusna polimeraza III (Pol III) koja nastaje prepisivanjem nekodirajuće regije u malih DNA virusa. Lokalizirana je u jezgri i sudjeluje u virusnoj DNA replikaciji (30).



Slika 2. Transkripcijska karta HBoV 1. Prikazane su glavne transkripcijske oznake: ponavljajuće terminalne sekvence (LEH i REH), promotorska mjesta (P) te mjesta izrezivanja

(D) i akceptiranja (A) introna i egzona (od engl. *splice donor and acceptor*). Svi identificirani mRNA transkripti navedeni su ispod karte (označeni R1 do R6), s njihovim veličinama prikazanim s lijeve strane i detektiranim molekularnim masama izraženih proteina prikazanim s desne strane. Različiti ORF-ovi prikazani su plavom, crvenom ili zelenom bojom. NCR označava nekodirajuću regiju, a njen produkt BocaSR je prikazan ispod (prilagođeno prema Shao i sur.) (23)

1.1.4. Replikacija i stanični ciklus virusa

Prema načinu replikacije parvovirusi se mogu podijeliti na autonomne viruse, kao što je parvo B19, i viruse koji zahtijevaju pomoćni (od engl. *helper*) virus za svoju replikaciju, kao što je AAV (11). DNA replikacija autonomnih parvovirusa je najbolje proučena na modelu virusa glodavaca na kojem je pokazano da replikacija ovisi o staničnoj mašineriji i brojnim staničnim proteinima pri čemu je neophodno da stanica uđe u S fazu. Međutim, *in vitro* studije pokazale su da se HBoV 1 replicira u dobro diferenciranim mitotski neaktivnim epitelnim stanicama dišnih puteva HAE-ALI, za razliku od primjerice parvo B19 koji se umnaža u mitotski aktivnim prekursorima eritrocita, što ga čini jedinstvenim među autonomnim parvovirusima (22, 31–33).

Parvovirusi u stanice ulaze endocitozom posredovanom receptorom (slika 3). U slučaju parvo parvo B19, receptor je globozid ili eritrocitni P antigen, dok $\alpha 5\beta 1$ integrin služi kao koreceptor. AAV ima široki tkivni tropizam i može inficirati brojne domaćine vjerojatno zato što više od jedne stanične molekule koristi kao receptor, npr. heparan sulfat proteoglikan, receptor za faktor rasta humanih fibroblasta 1 i $\alpha V\beta 5$ integrin. Za HBoV 1 sam receptor još nije otkriven, ali se vjerojatno nalazi na cilijarnim stanicama dišnog epitela i to na apikalnoj i bazolateralnoj strani (34). Nakon vezanja na receptor, virusna kapsida ulazi u stanicu endocitozom posredovanom klatrinom. Virus nakon ulaza vjerojatno putuje preko ranog i kasnog endosoma do jezgre. Infekcija je inhibirana obradom stanice različitim lizozimotropnim tvarima, što sugerira da je za infekciju potreban niski pH u endosomu. Mehanizam bijega iz endocitotskog mjehurića u citosol nije posve razjašnjen, a u njemu sudjeluje VP1 kapsidni protein. Kapsida se ispušta u perinuklearnom prostoru, zatim putuje do jezgre aktivnim transportom te u jezgru ulazi preko nuklearnog kompleksa pora. Sam ulazak u jezgru vjerojatno zahtijeva modifikaciju kapside kako bi se otkrila NLS (od engl. *nuclear localization sequence*) regija VP1 proteina. U jezgri se ispušta virusni genom kojeg prepoznaju stanični mehanizmi (35).

DNA autonomnih parvovirusa je linearna jednolančana DNA sa palindromskim strukturama na terminalnim krajevima koja služi kao predložak (od engl. *template*) za replikaciju. Replikacija se odvija pomoću DNA polimeraze stanice domaćina te različitih staničnih proteina. U amplifikaciju virusa su uključene stanične polimeraze iz y obitelji DNA polimeraza (36). Starija istraživanja na autonomnim parvovirusima su utvrdila da je za umnažanje ovih virusa potrebno zaustavljanje stanice u S fazi mitoze, zbog čega se ovi virusi umnažaju u mitotski aktivnim stanicama. Međutim, istraživanja koja su proučavala replikaciju HBoV virusa su pokazala da ovaj virus može zaobići zaustavljanje stanice u S fazi i producirati zrele virione bez staničnog aresta. Deng i sur. su pokazali da HBoV 1 u stanicama inducira stanični odgovor na oštećenje DNA (DDR, od engl. *DNA damage response*) koji olakšava replikaciju virusnog genoma (37-39). DDR je složeni biološki sustav koji se aktivira kad je DNA u stanicama oštećena, pri čemu stanice aktiviraju niz mehanizama kako bi popravile oštećenu DNA i osigurale očuvanje integriteta genoma. DDR uključuje kompleksne signalne puteve i interakcije između brojnih proteina. Čini se da infekcija s HBoV 1 inicira DDR aktivacijom sve tri fosfatidiliinozitol-3-kinaza-povezane kinaze (PI3KK) koje su potrebne za amplifikaciju genoma HBoV 1 (40). U amplifikaciju su uključene i dvije y-DNA polimeraze Pol η i Pol κ. Na taj način je omogućena replikacija virusa i u stanicama koje su mitotski utišane, tj. koje se ne dijele (28).

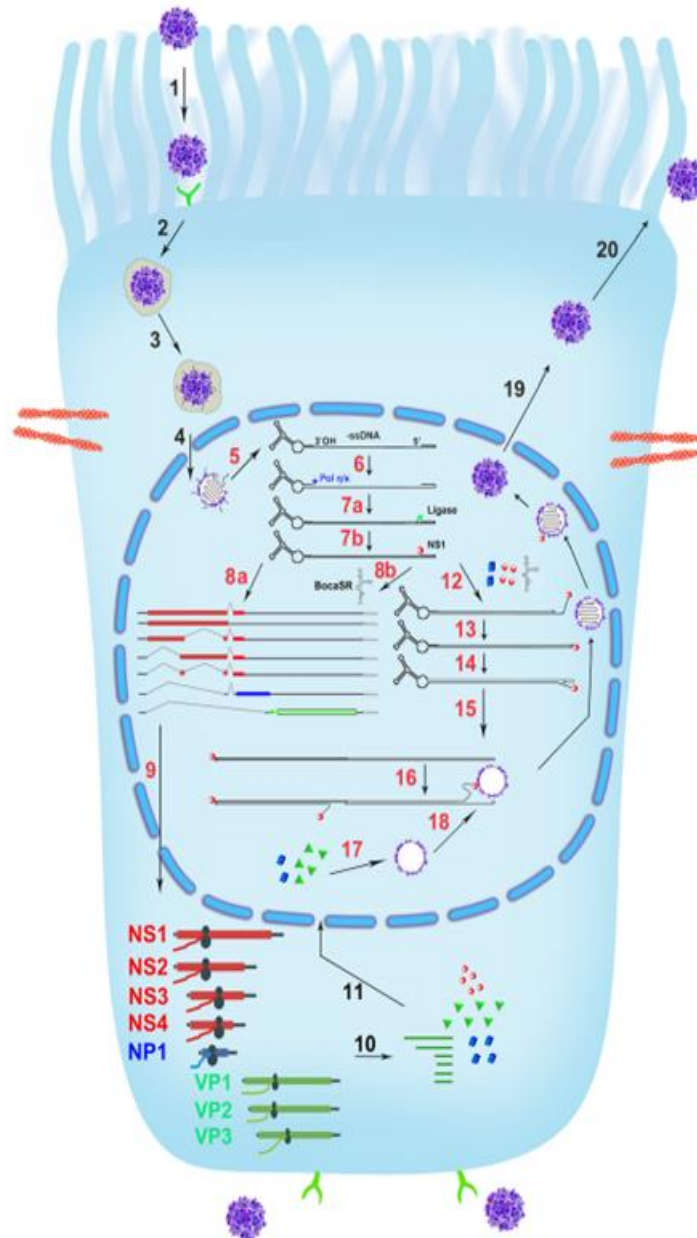
Analiza DNA HBoV 1 u inficiranim HAE-ALI stanicama otkrila je da ovaj virus umnaža svoj ssDNA genom prema tipičnom modelu ukosnice (engl. *hairpin*) kao i ostali parvovirusi.

Proces replikacije započinje formiranjem ukosnice na 3' kraju lanca virusne DNA presavijanjem jednolančane DNA unatrag, stvarajući petlju poput kvačice. To je moguće zbog postojanja palindromske strukture na terminalnim krajevima. Kad je jednom stvorena dvostruka DNA ukosnica, na nju se veže DNA polimeraza stanice domaćina na 3' kraju i koristi je kao početnicu (engl. *primer*) za započinjanje replikacije. Polimeraza produljuje početnicu dodavanjem komplementarnih nukleotida kako bi sintetizirala novi lanac DNA. Rastući lanac se kovalentno veže na 5' kraj i formira udvostručeni linearni model koji kovalentno vezan na oba kraja DNA ukosnicama. Kako replikacija napreduje, stvara se niz konkatemernih dimera i tetramera. Ključnu ulogu u replikaciji igra NS1 virusni protein koji kao glavni regulatorni protein ima aktivnost helikaze i adenzin trifosfataze (ATP-aze) te specifične nikaze (engl. *nickase*). NS1 protein prepoznaje i veže se na specifične sekvence ili strukture na virusnoj DNA koje označavaju mjesto gdje treba presjeći DNA lanac. Ove sekvence ili strukture često se nalaze unutar struktura novonastalog lanca koje se formiraju tijekom replikacije. NS1

protein posjeduje nukleaznu aktivnost, koja mu omogućuje rezanje DNA lanca na identificiranom mjestu presjecanja. Ova enzimska aktivnost omogućuje NS1 proteinu da prekine fosfodiesterske veze u DNA okviru, rezultirajući jednostranim prekidom ili rezom.

Nakon što je DNA sintetizirana, služi kao kalup za transkripciju virusne glasničke RNA (mRNA). Za autonomne parvoviruse transkripcijske sheme su vrlo raznolike, a regulacija transkripcije i posttranskripcijskih modifikacija je kompleksna. Nakon transkripcije slijedi sinteza proteina. Najranije tijekom infekcije se pojavljuju nestrukturani regulatni proteini NS1 i NS2 koji sudjeluju u ekspresiji gena. U kasnijoj fazi infekcije sintetiziraju se kapsidni proteini u citoplazmi i zatim sastavljaju u oligomere nakon čega se translociraju u jezgru. Kapsida postaje infektivna tek kada se u njoj nađe VP1 kapsidni protein, vjerojatno zbog njegove PLA2 aktivnosti. Slijedi pakiranje genoma u praznu kapsidu, što zahtijeva aktivnost većih virusnih nestrukturanih proteina i helikaznu aktivnost. Ovisno o tome na kojem kraju DNA započinje replikacija, razlikovat će se polarizacija virusne DNA i koji lanac će se pakirati češće. U slučaju virusa HBov 1 većinom se pakira negativno usmjerena DNA (ssDNA). Nakon sklapanja zrelih virusnih čestica one se mogu zadržati u jezgri, translocirati u citoplazmu ili transportirati izvan stanice u procesu koji je reguliran fosforilacijom kapsidnih proteina i aktivacijom gelsolina u citoplazmi (11).

Većina faza ciklusa umnažanja humanog bokavirusa nije još eksperimentalno potvrđena (22).



Slika 3. Slikovni prikaz ciklusa replikacije HBV virusa: HBV 1 ulazi u stanice vezivanjem za nepoznati virusni receptor, koji je izražen na apikalnim (cilijarnim) i bazalnim stanicama kako je naznačeno, putem endocitoze posredovane receptorom, praćene intracelularnim transportom (koraci 1-3). Virus izlazi iz kasnog endosoma i ulazi u jezgru (korak 4). U jezgri se otkriveni ssDNA virusni genom pretvara u replikativni oblik dsDNA koji eksprimira virusne NS proteine i BocaSR (koraci 5-8). Virusni DNA dalje se replicira u jezgri (koraci 12-16) i eksprimira nestrukturane i kapsidne proteine (koraci 9-11), nakon čega slijedi pakiranje genoma u prazne kapside (koraci 16-18). Na kraju, zrele virusne čestice izlazi iz zaraženih stanica (koraci 19, 20).

Prilagođeno prema Shao i sur. (23)

1.1.5. Patogeneza i imunološki odgovor

Patogeneza infekcije humanim bokavirusom je slabo proučena zbog poteškoća u uzgoju virusa na staničnim linijama i nedostatka odgovarajućeg eksperimentalnog animalnog modela. Dugo je bilo potrebno da istraživači uspiju uzgojiti virus u staničnim kulturama, prvenstveno zbog nedostatka poznavanja odgovarajućih receptora na stanicama. Prve *in vitro* studije napravljene su 2009. godine na kulturama HAE-ALI (41). Naknadno je utvrđeno da se i druge stanične linije mogu inficirati ovim virusom, npr. HEK293, što je otvorilo mogućnost daljnjeg istraživanja biologije ovog virusa (42).

Ulazno mjesto virusa su dišni putevi. Rezultati studije na modelu HAE-ALI dišnog epitela pokazuju da je HBoV 1 sposoban zaraziti polarizirane primarne HAE stanice s bazolateralne površine. Također pokazuju da je bazolateralna infekcija trajno produktivna, uzrokuje gubitak cilija i na kraju narušava čvrstu barijeru (od engl. *tight junction*) epitela. Međutim, u usporedbi s apikalnom infekcijom HBoV 1, bazolateralna infekcija je manje učinkovita, što sugerira da HBoV 1 infekcija ima jači apikalni tropizam. Bazolateralna infekcija također ukazuje da HBoV 1 viremija može olakšati virusnu infekciju cijelog dišnog sustava u bolesnika (43).

Primarna HBoV 1 infekcija je sistemska infekcija, s obzirom da se virusna DNA može detektirati u serumu te je viremija usko vezana s težinom bolesti (44).

In vivo ispitivanja bronhoalveolarne tekućine inficiranih osoba pokazala su povećanu količinu citokina EGF (od engl. *epidermal growth factor*), VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*), CCL17 (od engl. *chemokine C-C motif ligand 17*), TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor alpha*), TNF- β (od engl. *tumor necrosis factor beta*) i TIMP (od engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) te bi oštećenje epitela moglo biti regulirano indukcijom ovih citokina (45, 46).

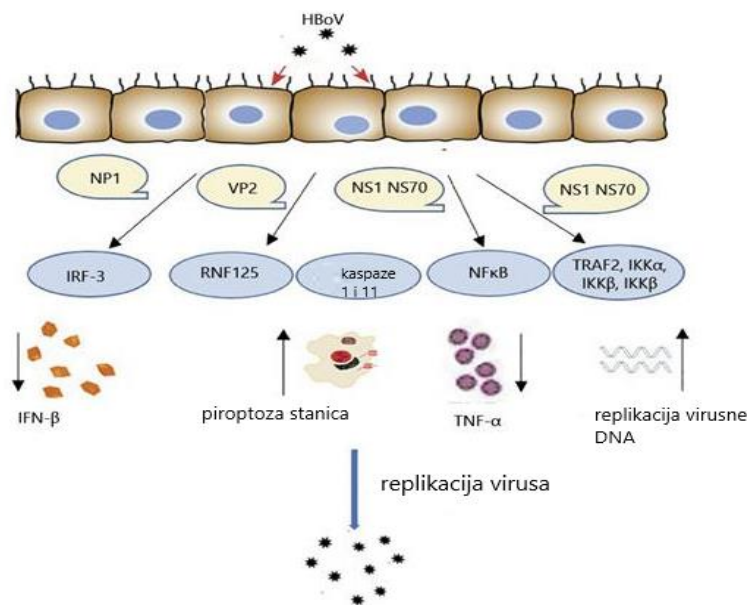
Način na koji bokavirusi oštećuju stanice je zanimljiv i jedinstven među parvovirusima. Naime, glavni mehanizam kojim parvovirusi izazivaju smrt stanica je apoptoza (47), a postoje izvještaji da parvovirusi mogu ubiti stanice i putem neapoptotskih mehanizama; primjerice, infekcija BPV-om inducira nekroptotsku smrt stanica embrijskih stanica traheje goveda (48). Nova istraživanja pokazuju da infekcija epitelnih stanica dišnog sustava čovjeka bokavirusom rezultira također smrću stanica, no glavni mehanizam stanične smrti nije apoptoza, već piroptoza. Piroptoza je programirani proces stanične smrti koji karakterizira oticanje stanica, ruptura plazmatske membrane i oslobađanje proupalnih molekula iz unutarstaničnog prostora.

Obično se pokreće specifičnim vrstama staničnog stresa ili infekcijom, posebice uzrokovanom bakterijama, a rjeđe virusima. Piroptoza ima važnu ulogu u imunološkom odgovoru za eliminaciju zaraženih ili oštećenih stanica te pokretanje upalne reakcije radi borbe protiv infekcije. Taj proces uključuje stvaranje NLRP3 (od engl. *NOD-like receptor pyrin domain containing protein 3*) inflamasoma kao ključne komponente urođene imunosti i aktivaciju upalnih kaspaza, poput kaspaze-1, koje aktiviraju proupalne citokine interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-18 (IL-18) (49). Čini se da NLRP3 posredovan adaptorskom bjelančevinom (ASC, od engl. *apoptosis-associated speck-like protein*) djeluje kao receptor za prepoznavanje molekularnih obrazaca (PRR, od engl. *pattern recognition receptor*) koji potiču piroptozu induciranu bokavirusom HBoV 1. Pokazano je da je u infekciji HBoV 1 virusom značajno pojačana ekspresija anti-apoptotskih gena BIRC6 (od engl. *baculoviral IAP repeat containing 6*) i IFI6 (od engl. *interferon alpha inducible protein 6*) u epitelnim stanicama. Na taj način virus modulira mehanizme stanične smrti i vodi stanicu u piroptozu, umjesto u apoptozu ili nekroptozu. To je ujedno i prvi put da je piroptoza dokazana na stanicama dišnog epitela inficiranima respiratornim virusom. Također se spekulira da je na ovaj način HBoV stekao evolutivnu prednost uspostavljanjem trajne infekcije u stanicama (50). Manipulacija staničnog odgovora bi dijelom mogla objasniti dugotrajno izlučivanje virusne DNA u respiratornim sekretima.

Saznanja o imunološkom odgovoru domaćina su također oskudna. Glavni imunološki odgovor protiv virusne infekcije čini IFN i indukcija staničnog odgovora, a sam imunološki odgovor se može podijeliti na urođeni i stečeni.

U serumu oboljelih moguće je dokazati cirkulirajuća protutijela, a istraživanja *in vitro* govore da virus može inducirati tipični antivirusni imunosni odgovor koji uključuje Th1 i Th2 stanice (51). Većina saznanja o patogenezi parvovirusa se ekstrapolira iz istraživanja na kapsidi parvovirusa B19. Podaci iz studija o parvo B19 pokazuju da kapsidni proteini vjerojatno igraju glavnu ulogu u imunosnom odgovoru domaćina. Iako su veličina i struktura kapsida parvovirusa jednostavni, svaka komponenta kapside obavlja važnu funkciju u životnom ciklusu virusa. Proteini kapside sudjeluju u prepoznavanju stanica, endosomskom putu i nuklearnom transportu te potiču imunosni odgovor domaćina (52). Istraživanja sugeriraju da bi i kapsidni proteini HBoV, osobito VP2, mogli sudjelovati u indukciji snažnih humoralnih i staničnih imunosnih odgovora (53).

Općenito je poznato da virusi induciraju robustan imunski mehanizam te da sekrecija interferona u tome igra ključnu ulogu. HBoV može inhibirati sekreciju interferona, a mehanizam inhibicije posredovan je proteinom NP1 koji blokira proizvodnju IFN- β preko IRF-3 signalizacije (54). Druga studija je označila strukturni protein VP2 HBoV 1 kao modulator interferenskog puta ciljajući specifični protein koji je negativni regulator signalizacije tipa I IFN, čime pojačava proizvodnju IFN- β . Ova inhibicija negativnog regulatora signalizacije tipa I IFN-a utječe na imunski odgovor domaćina i olakšava replikaciju virusa (55). Dalje, proteini NS1 i NS1-70 djeluju kao antagonisti transkripcijskog faktora NF- κ B (od engl. *nuclear factor-kappa B*) čime se smanjuje lučenje TNF- α . Dodatno, ovi proteini interferiraju sa TNF- α signalnim transducerima TRAF2 (od engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), IKK- α , (od engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*), IKK- β (od engl. *nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*). Na taj način virus uspješno izmiče urođenom imunskom odgovoru domaćina te se uspješno replicira u stanicama dišnog epitela (slika 4) (56).



Slika 4. Shematski prikaz izbjegavanja imunskog odgovora domaćina i uspješne replikacije HBoV

Bokavirusi su razvili strategije za izbjegavanje imunskog otkrivanja inhibicijom produkcije IFN- β ciljanjem na IRF-3 i RNF125 signalne puteve. Proteini NS1 i NS1-70 djeluju kao antagonisti NF- κ B te pomažu bokavirusu u izbjegavanju urođenog imuniteta. Infekcija HBoV

1 inducira piroptotsku staničnu smrt epitelnih stanica dišnih puteva domaćina kako bi olakšala replikaciju virusa. Prilagođeno prema Bhat i sur. (56)

Adaptivni imunski odgovor uključuje T i B staničnu imunost. Za antivirusnu aktivnost su ključne T-pomoćnički limfociti, kako izravno, tako i neizravno. Njihove izravne aktivnosti ostvaruju se putem proizvodnje antivirusnih citokina, dok se njihove neizravne aktivnosti posreduju putem Th uzoraka koji potiču B stanice i citotoksične T stanice (4). U studiji na djeci s akutnim bronhiolitisom, Chung i sur. su pokazali da su koncentracije interferona-gama (IFN- γ), interleukina-2 (IL-2) i interleukina-4 (IL-4) u sekretu (ili uzorku) obriska nazofarinksa djece pozitivne na HBoV više u usporedbi s asimptomatskim kontrolama; međutim, razine citokina IL-10 i TNF- α bile su niže nego kod djece pozitivne na respiratorni sincicijski virus (RSV) (52). Nadalje, druge studije su pokazale da HBoV 1 inducira CD4+ T stanice na proizvodnju IFN- γ , IL-10 i IL-13 (57, 58). Ti nalazi sugeriraju da HBoV infekcija može potaknuti proizvodnju Th1 i Th2 citokina. Imunosni Th1 odgovor induciran bokavirusom putem IL-2 i IFN- γ dovode do eliminacije virusa, dok aktivacija Th2 odgovora putem IL-10 i IL-13 uzrokuje patološke promjene u dišnom sustavu koje se očituju sipnjom (engl. *wheezing*). U slučaju dvojne koinfekcije s drugim virusima, čini se da ravnoteža više naginje prema non-Th 2 tipu citokinskog odgovora (57).

Novija istraživanja podupiru tezu da HBoV može ustanoviti perzistenciju u stanicama domaćina, a sam tkivni tropizam, tj. mjesto perzistencije virusa nije razjašnjeno (59). Nekoliko studija pokazalo je da je DNA bokavirusa čest nalaz u tkivu tonzila djece s hipertrofijom tonzila, što bi moglo ukazivati da su tonzile i adenoidi mjesto produljene replikacije HBoV te moguće mjesto perzistencije (60, 61).

1.1.6. Epidemiologija

HBoV se pojavljuje u svim dijelovima svijeta te je dokazan u infekcijama dišnog i probavnog sustava u djece i odraslih na svim kontinentima (2,4).

Guido i sur. su u radu iz 2016. procijenili da je globalna prevalencija infekcije bokavirusom oko 6 %, točnije 6,3 % u uzorcima iz dišnog sustava, a 5,9 % u uzorcima iz probavnog sustava, dok su Jartti i sur. izvijestili da se prevalencija u bolesnika s infekcijama donjeg i gornjeg dišnog sustava kreće od 2 do 19 % (2).

Prema meta-analizi koju su proveli Polo i sur. 2021. godine, ukupna (engl. *pooled*) prevalencija u Europi iznosi 9,6 %, s visokim indeksom heterogenosti od 97 %. Ovisno o vrsti istraživanja i geografskom porijeklu, prevalencija je varirala od 2 % u Finskoj do 46 % u Italiji (tablica 2). Ista studija pokazala je da je u prosjeku u više od polovice slučajeva (54,1 %) HBoV detektiran u kodetekciji s drugim virusom (62). Slične podatke o učestalosti koinfekcije iznijeli su i Guido i sur., gdje se učestalost koinfekcije u respiratornim infekcijama kretala od 8,3 % do 100 %, prosječno u 52,4 % uzoraka iz respiratornog trakta i u 46,7 % gastrointestinalnih uzoraka (4). Prema Jarttiju i sur., učestalost kodetekcije je još i veća, 83 % u uzorcima respiratornim, a do 100 % u uzorcima stolice (2).

Tablica 2. Prikaz studija prevalencije infekcije humanim bokavirusom u Europi. Prilagođeno prema Polo i sur. (62)

Autori studije	Godina	Zemlja	Prevalencija HBoV (%)	Monoinfekcija (%)	Koinfekcija (%)
Foulogne i sur.	2006.	Francuska	4,41	65,38	34,62
Weissbrich i sur.	2006.	Njemačka	10,42	60,92	39,08
Allander i sur.	2007.	Švedska	18,92	24,49	75,51
García-García i sur.	2007.	Španjolska	16,92	20,41	79,59
Gerna i sur.	2007.	Italija	9,86	30,95	69,05
Kleines i sur.	2007.	Njemačka	12,77	58,33	41,67
Maggi i sur.	2007	Italija	3,17	55,56	44,44
Pozo i sur.	2007	Španjolska	15,75	35,65	64,35
Volz i sur.	2007.	Njemačka	2,83	63,64	36,36
Brieu i sur.	2008.	Francuska	10,85	60,00	40,00
Calvo i sur.	2008.	Španjolska	13,94	80,81	19,19
Christensen i sur.	2008.	Norveška	11,97	22,22	77,78
Esposito i sur.	2008.	Italija	7,43	49,49	50,51
Jacques i sur.	2008.	Francuska	12,50	58,33	41,67
Pierangeli i sur.	2008.	Italija	8,19	38,82	61,18
vonLinstow i sur.	2008.	Danska	21,50	43,75	56,25
Midulla i sur.	2008.	Italija	12,09	31,82	68,18
Don i sur.	2010.	Italija	11,88	66,67	33,33
Haidopoulou i sur.	2010.	Grčka	3,24	66,67	33,33,
Kantola i sur.	2010.	Finska	2,00	NP	NP
Guido i sur.	2011.	Italija	45,69	50,94	49,06
Nawaz i sur.	2012.	UK	7,40	54,00	46,00
Risku i sur.	2012.	Finska	9,29	23,91	76,09
Uršič i sur.	2012.	Slovenija	20,79	37,97	62,03
Bajolle i sur.	2014.	Francuska	21,88	85,71	14,29
Paloniemi i sur.	2014.	Finska	12,46	NP	NP
Principi i sur.	2015.	Italija	5,70	54,81	45,19
LaRosa i sur.	2016.	Albanija	9,15	0,00	100,00
Calvo i sur.	2016	Španjolska	9,74	25,08	74,92
Nicolai i sur.	2017	Italija	3,66	60,00	40,00
Korsun i sur.	2019.	Bugarska	6,99	55,56	44,44

Praznik i sur.	2018	Slovenija	18,39	NP	NP
Verbeke i sur.	2019.	Belgija	6,68	6,49	93,51
Bagasi i sur.	2020.	UK	2,03	23,24	76,76
Sobkowiak i sur.	2020.	Poljska	11,88	41,67	58,33

NP, nema podataka

Podaci za Hrvatsku su ograničeni na nekoliko studija. U studiji Ljubin-Sternak i sur. iz 2016., HBoV je detektiran u 10,5 % uzoraka djece hospitalizirane zbog akutne respiratorne infekcije virusne etiologije (63), dok je u retrospektivnoj studiji iz 2018. godine bio drugi najčešće detektirani virus poslije RSV-a, s prevalencijom od 23,1 % (64). U pilot studiji koja je prethodila ovom israživanju, HBoV je detektiran u 6,2 % uzoraka (65).

Virusna DNA se dugo izlučuje nakon preboljele infekcije te se može detektirati i do 75 dana nakon infekcije u uzorcima nazofarinksa imunokompetentnih osoba (66), a može se detektirati i u asimptomatskih osoba (67). Prema danskoj studiji, HBoV je pronađen u 8,6 % uzoraka respiratornih asimptomatske djece mlađe od jedne godine, a sama detekcija PCR-om ne znači nužno da je ovaj virus uzročnik bolesti (68).

Seroprevalencija HBoV ovisi o dobi i kreće se od 40 % u djece dobi od 18 do 23 mjeseca do virtualno 100 % u djece starije od 2 godine, a prosječno iznosi 76,6 % u djece i 96 % u odraslih. Viša seroprevalencija utvrđena je u dobnoj skupini od 0 do 5 mjeseci (73,7 %), što je vjerojatno povezano s još uvijek cirkulirajućim majčinim protutijelima (69-71).

Virus se pojavljuje tijekom cijele godine, čini se predominantno u zimskim i proljetnim mjesecima u umjerenom pojasu (56, 63), premda Christensen (72) navodi da nije uočena jasna sezonalnost virusa.

Detekcija HBoV do sada je opisana samo kod ljudi. Putevi prijenosa ovog virusa nisu do kraja poznati, ali vjerojatno se prenosi kao i većina parvovirusa kapljično ili kontaktom sa zaraženim tjelesnim tekućinama (sputumom, urinom ili fecesom) (11). Prijenos HBoV 1 događa se preko sekreta dišnog sustava, dok su HBoV 2-4 detektirani u uzorcima stolice te se vjerojatno prenose feko-oralnim putem. Vertikalni prijenos s majke na dijete nije opisan, moguće zbog postojanja imuniteta u trudnica (2, 71).

HBoV je opisan kao potencijalni uzročnik bolničkih infekcija, a nozokomijalni prijenos virusa iznositi i do 18 %. Još 2006. godine Bastien i sur. su pretpostavili vjerojatnu intrahospitalni prijenos virusa u 12 djece koja su bila hospitalizirana duže od 10 dana prije infekcije (73), a

studija Durigon i sur. naglasila je važnost HBoV kao mogućeg bolničkog patogena u neonatalnim jednicama intenzivnog liječenja (74).

1.1.7. Kliničke značajke

Klinička očitovanja respiratorne infekcije uzrokovane humanim bokavirusom u djece slične su infekciji drugim respiratornim virusima. Najčešće započinju vrućicom, zimicom, kašljem i otežanim disanjem kojima se ponekad pridružuju povraćanje i proljev (72). Brojne studije dokazale su povezanost između detekcije ovog virusa i kašlja, rinoreje i akutne upale uha (75-80). Među hospitaliziranom djecom najčešće dijagnoze bile su rinitis, akutna upala srednjeg uha, pneumonija, bronhiolitis i akutna egzacerbacija astme (81-84).

Studije slučaj-kontrola (engl. *case-control*) pokazale su statistički značajnu povezanost monoinfekcije, visoke koncentracije virusne DNA u nazofaringealnom sekretu i viremije s infekcijama donjeg dišnog sustava (72,85,86).

Prema istraživanjima u kojima je HBoV 1 uspoređivan s RSV-om, čini se da je bronhiolitis češći tijekom RSV infekcije, a pneumonija kod HBoV 1 infekcije, što bi moglo biti povezano s različitom dobi oboljelog djeteta (87).

Studija Allandera i sur. ispitala je povezanost sipnje s HBoV te su pokazali da je bokavirus bio prisutan u 19 % djece sa sipnjom, od čega je 5 % imalo monoinfekciju, većinom u visokoj koncentraciji (79). Također su kod tih bolesnika dokazali prisutnost DNA virusa u krvi, što govori u prilog sustavne infekcije (81). Zanimljivo, studija koja je promatrala imunosni odgovor u djece kod koje je HBoV kodetektiran s humanim rinovirusom (HRV) pokazala je da koinfekcija s HBoV 1 i HRV rezultira modificiranim non-Th 2 tipom citokinske reakcije. Ovo otkriće sugerira da HBoV 1 može mijenjati imunosni odgovor induciran HRV-om. Klinički nalaz u ove djece pratio je uočeni imunosni odgovor te su ova djeca kasnije rjeđe razvijala ponavljajuće epizode sipnje u odnosu na one sa monoinfekcijom HRV-om (88).

Dalje, HBoV može dovesti do kliničkog pogoršanja i egzacerbacije kroničnih bolesti pluća kao što su astma ili cistična fibroza (89, 90).

U literaturi su opisani pojedinačni slučajevi teške, za život opasne pa čak i fatalne infekcije ovim virusom, većinom u djece mlađe od 2 godine. Najčešća klinička prezentacija bila je opstruktivna bolest donjeg dišnog sustava, a smrt je bila posljedica zatajenja disanja (91-93).

U imunokompromitiranih osoba opisane su teže kliničke slike kao i slučajevi encefalitisa i hepatitisa (94,95). Potrebna su daljnja istraživanja za razjašnjavanje uloge humanog bokavirusa u bolesnika s ovim infektivnim bolestima.

Kod infekcije bokavirusom laboratorijski parametri upale najčešće su u granicama normale ili tek blago povišeni, dok se kod djece u kojih je učinjena radiološka obrada najčešće nađu peribronhalni ili intersticijski infiltrati, hiperinflacija ili atelektaze (96, 97).

Čimbenici rizika koji se povezuju s težom kliničkom slikom slični su kao i kod drugih respiratornih virusnih infekcija: kronična bolest srca i pluća, prematuritet, maligne bolesti i imunosupresija. S obzirom da HBoV izaziva dugotrajni humoralni imunosni odgovor, za očekivati je da su djeca s oštećenom B-staničnom imunošću u većem riziku, kako navodi Christensen (72).

Dob bolesnika može se smatrati čimbenikom rizika jer se većina simptomatskih infekcija događa u djece mlađe od dvije godine. Ipak, čini se da majčina protutijela igraju zaštitnu ulogu u prvih šest mjeseci života (98). Drugi čimbenici rizika slični su kao i za druge respiratorne bolesti u djece te uključuju pušenje majke za vrijeme trudnoće, rođenje tijekom zimskih mjeseci i astmu u obiteljskoj anamnezi (72). Čini se da se atopija ne povezuje s infekcijom humanim bokavirusom (99).

U studijama kod odraslih i osoba u dobi iznad 65 godina rijetko se detektira HBoV 1 DNA, vjerojatno zbog postojanja cirkulirajućih protutijela, te je većina do sada provedenih studija orijentirana na dječju dob (100). Opisan je slučaj fatalne primoinfekcije humanim bokavirusom u imunokompetentne bolesnicu u dobi od 70 godina (101). Potrebne su daljnje studije kako bi se rasvijetlila uloga humanog bokavirusa u ovoj dobnoj skupini.

HBoV 2-4 najčešće se detektiraju iz uzoraka stolice, ali njihova uloga u infekcijama probavnog sustava nije do kraja razjašnjena (5, 102).

1.1.8. Dijagnostika

1.1.8.1. Izravna dijagnostika

Laboratorijska dijagnostika HBoV infekcije temelji se na molekularnim metodama direktne detekcije virusa. Prva dijagnostička metoda bio je konvencionalni PCR (od engl. *polymerase*

chain reaction), a najčešće korišten protokol onaj koji su ustanovili Allander i sur. (1). Ubrzo nakon toga razvijen je PCR u realnom vremenu (od engl. *real time* PCR) (103).

Molekularna dijagnostika PCR-om omogućuje dokaz dijela genoma virusa iz uzoraka nazofaringealnog i bronhoalveolarnog sekreta, uzoraka stolice, seruma i urina umnažanjem NP1, NS1 i/ili VP1/2 genskih regija. NP1 i NS1 regije konzerviranije su od VP1/2 regije te su zato češće korištene ciljne sekvence (2, 4, 72, 103, 104). Sekvence PCR produkata NP-1 regije imaju identičan slijed nukleotida u više od 98 % slučajeva, dok je heterogenost sekvenci u VP1/VP2 regiji značajno veća te su to sekvence koje su prikladnije za korištenje u filogenetskoj analizi virusa. Neke od korištenih početnica prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Pregled početnica i proba sa ciljnim sekvencama gena HBoV te njihova primjena: A) Početnice i probe opisane u radu Neske i sur. (103); B) Početnice i probe korištene u *real time* PCR-u koji su razvili Lu i sur. (104).

A) Početnice i probe opisane u radu Neske i sur.					
Početnica ili proba	Sekvenca (5'-3')	Gen	Položaj	Polaritet	Upotreba
BoV542R	CTCTGTGTTGACTGAATACAG	NP-1	2704-2684	-	Kvalitativni PCR
BoV2391s	GCACAGCCACGTGACGAA	NP-1	2391-2408	+	Real-time PCR
BoV2411s-TM	6FAM-TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAA GCATCG-TMR	NP-1	2411-2441	+	Real-time PCR
BoV2466a	TGGA CTCCCTTTTCTTTTGTAGGA	NP-1	2466-2443	-	Real-time PCR
BoV3885s	ACAATGACCTCACAGCTGGCGT	VP-2	3885-3906	+	Filogenetska analiza
BoV4287s	CAGCCAGCACAGGCAGAATT	VP-2	4287-4306	-	Filogenetska analiza
BoV4456a	TCCAAATCCTGCAGCACCTGTG	VP-2	4456-4435	+	Filogenetska analiza
BoV4939a	TGCAGTATGTCTTCTTTCTGGACG	VP-2	4939-4916	-	Filogenetska analiza

B) Početnice i probe korištene u *real time* PCR-u koji su razvili Lu i sur.

Početnica ili proba	Sekvenca (5'-3')	Gen	Položaj	Upotreba
rev	CTG TCC CGC CCA AGA TAC A	NS-1	1641-1623	
proba	CCA GGA TTG GGT GGA ACC TGC AAA	NS-1	1598-1621	
fwd	AGA GGC TCG GGC TCA TAT CA	NP-1	2478-2497	Real-time PCR
rev	CAC TTG GTC TGA GGT CTT CGA A	NP-1	2558-2537	
proba	AGG AAC ACC CAA TCA RCC ACC TAT CGT CT	NP-1	2500-2528	

Radovi u kojima je uspoređivan *real time* PCR s konvencionalnim PCR-om pokazali su da je *real time* PCR specifičniji zbog umnažanja kraćeg fragmenta DNA virusa (76 bp u odnosu na 354 bp). Osjetljivost oba testa bila je slična, a limit detekcije za *real time* PCR bio je oko 10 kopija genoma (104). Međutim, glavna prednost *real time* PCR-a u odnosu na konvencionalni je mogućnost određivanja količine virusa u uzorku. Naime, interpretacija i kliničko značenje pozitivnog PCR nalaza na HBoV otežana je činjenicom da se ovaj virus često dokazuje u kodetekciji s drugim respiratornim virusima kao i u asimptomatskih osoba. Zbog toga je kvantitativni PCR predložen kao prikladniji dijagnostički pristup u odnosu na konvencionalni, a kao klinički značajna količinu virusa uzeta je granica od 10^4 kopija DNA virusa po ml uzorka nazofaringealnog sekreta (45, 105).

U okviru sindromskog testiranja razvijeni su i *multipleks* PCR testovi te je HBoV uključen u *multipleks* PCR panele za dijagnostiku respiratornih infekcija (4, 106). U tablici 4 dan je pregled nekoliko *multipleks* sindromskih panela koji detektiraju HBoV.

Tablica 4. Primjeri *multipleks* PCR testova koji sadrže početnice za detekciju humanog bokavirusa

Proizvođač	Naziv testa	Broj detektiranih patogena
Seegene	Seeplex [®] RV15 OneStep ACE Detection	15
AUS Diagnostics	Respiratory Viruses 16-well	14
Luminex DiaSorin	Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel	20
Roche Diagnostics	ePlex [®] Respiratory Pathogen Panel 2	24

Drugi dijagnostički pristup uključuje testove kojima se detektira mRNA bokavirusa u uzorcima iz dišnog sustava ili DNA bokavirusa u krvi oboljele osobe. Prednost testova koji detektiraju mRNA virusa je visoka specifičnost, dok klinička osjetljivost ovisi o trajanju ekspresije mRNA u nazofarinksu. Prisutnost DNA virusa u plazmi ili serumu čini se specifična za akutnu fazu infekcije; DNA se rijetko detektira u zdravih osoba, premda je dokazana u uzorcima krvi dobrovoljnih davatelja (107). Trajanje viremije u akutnoj infekciji kratkotrajno je zbog čega je klinička vrijednost ovih testova upitna (72).

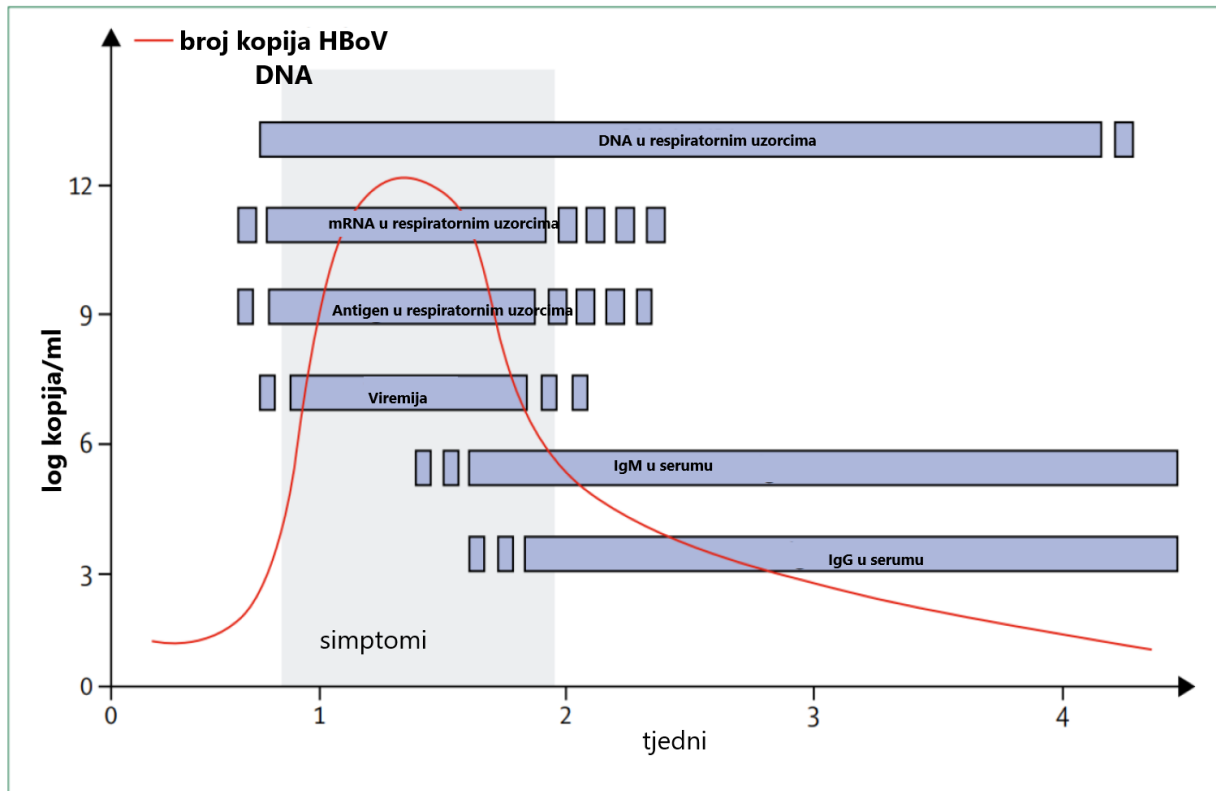
Razvijen je i brzi POC (od engl. *point-of-care*) antigeni test, koji se temelji na korištenju fluorescentno obilježenih antitijela na VP2 kapsidni antigen (108). Radi se o mariPOC tehnologiji, za izvođenje testa je potrebna posebna aparatura, a sam test nije komercijalno dostupan. Potrebne su daljnje studije za evaluaciju ovog testa u kliničkoj praksi (108).

Budući se ovaj virus može izolirati isključivo u HAE-ALI stanicama koje zahtijevaju posebne uvjete uzgoja, izolacija bokavirusa ne rabi se u rutinske dijagnostičke svrhe.

1.1.8.2. Neizravna dijagnostika

Serološke metode dijagnostike nisu komercijalno dostupne i uglavnom se radi o *in house* metodama. Izrada ovih testova još je u povojima i praćena je brojnim poteškoćama, prvenstveno zbog križne reaktivnosti s druga tri tipa bokavirusa. Stoga je interpretacija nalaza složena i dodatno otežana nedovoljno proučenom biologijom bokavirusa i mogućnošću njegove perzistencije u zaražene osobe (109). Međutim, pozitivan nalaz IgM protutijela u serumu, zajedno s niskom avidnošću IgG protutijela, ili četverostruko povećanje titra IgG

protutijela u parnim uzorcima seruma, dokaz su akutne HBoV 1 infekcije te imaju veću specifičnost od kvalitativnog PCR-a. S druge strane, zbog relativno kasne serokonverzije, ovim testovima nedostaje osjetljivost tijekom akutne primoinfekcije (slika 5).



Slika 5. Prikaz dijagnostički značajnih varijabli u tijeku primoinfekcije HBoV. Prilagođeno prema Christensen i sur. (72)

1.1.9. Liječenje i prevencija

Za sada ne postoji specifično antivirusno liječenje oboljelih od infekcije humanim bokavirusom. Liječenje se temelji na simptomatskoj terapiji i respiratornoj potpori kod djece s težom kliničkom slikom. To uključuje antipiretike, bronhodilatatore za djecu s opstrukcijom te nadomjesno liječenje kisikom za djecu s hipoksijom. Studije su pokazale da se u terapiji često koriste kortikosteroidi (110, 111). Međutim oni se nisu pokazali korisnima za liječenje djece s dokazanom infekcijom humanim bokavirusom (112). Vrlo često se neopravdano koristi empirijska antibiotska terapija, čak i bez dokazane bakterijske koinfekcije (113).

Prisutnost virusa u dišnom sustavu i stolici ukazuje na to da bi se uz standardne mjere sprječavanja infekcije trebale provoditi i mjere kontaktne izolacije za vrijeme trajanja simptomatske infekcije kod male djece i dojenčadi. Epidemiološke mjere trebalo bi prilagoditi

za imonokompromitiranu djecu kod koje je moguće produljeno lučenje virusa i nakon povlačenja simptoma bolesti (114).

Za sad nisu razrađene specifične mjere prevencije.

1.2. Svrha rada

Premda je HBoV poznat kao uzročnik infekcije u ljudi već 20 godina, dijagnostika ovog virusa u praksi je još uvijek manjkava i nedostupna. Brojna istraživanja potvrdila su patogeni potencijal ovog virusa u djece te ga svrstala među najvažnije uzročnike virusnih infekcija dišnih puteva u djece. Svrha ovog rada bila je istražiti epidemiološka obilježja infekcije humanim bokavirusom u djece hospitalizirane zbog ARI u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Time bi se procijenila potreba za uključivanjem ovog virusa u naše algoritme za dijagnostiku respiratornih infekcija u hospitalizirane djece. Trenutno dostupne metode dijagnostike svode se na detekciju HBoV kvalitativnim PCR-om u uzorcima iz dišnog sustava. Virus je uključen u sindromske panele za dijagnostiku respiratornih infekcija, premda se čini da sam dokaz genskog materijala virusa u uzorku nije dovoljna informacija za interpretaciju kliničkog značenja ovog virusa. Dodatne metode, kao što su serologija, dokaz virusne mRNA ili dokaz DNA virusa u krvi, zahtijevaju značajan stručni, ali i financijski napor što ih često čini nedostupnima za svakodnevnu praksu. Istražit ćemo značenje koncentracije virusa u uzorku u odnosu na kliničku sliku, pri čemu ćemo za opis težine kliničke slike promatrati lokalizaciju infekcije, potrebu za nadomjesnim liječenjem kisikom te trajanje hospitalizacije u ispitanika. Time nam je cilj dodatno razjasniti ulogu HBoV u patogenezi respiratornih infekcija te procijeniti potrebu za uvođenjem rutinske dijagnostike ovog virusa u evaluaciji bolesnika s infekcijama dišnog sustava.

2. HIPOTEZA

Djeca s visokom koncentracijom DNA humanog bokavirusa u sekretu nazofarinksa (više od 10^4 kopija DNA bokavirusa po ml) češće imaju infekciju donjeg dišnog sustava, češće trebaju nadomjesno liječenje kisikom i zahtijevaju dulje bolničko liječenje od djece s niskom koncentracijom DNA bokavirusa.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Istražiti epidemiološka i klinička obilježja akutne respiratorne infekcije u hospitalizirane djece kod koje je detektiran humani bokavirus.

3.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi prevalenciju HBoV, učestalost monoinfekcije i koinfekcije/kodetekcije s drugim respiratornim virusima, sezonsku pojavnost, dob i spol bolesnika, kliničku prezentaciju i komorbiditete u ispitanika (ili hospitalizirane djece).
2. Odrediti koncentraciju DNA humanog bokavirusa u sekretu nazofarinksa oboljelih i odrediti genotipove detektiranih sojeva humanog bokavirusa.
3. Ispitati postoji li povezanost između pojavnosti infekcija donjeg dišnog sustava, duljine hospitalizacije i potrebe za nadomjesnim liječenjem kisikom s visokom koncentracijom HBoV u uzorku (engl. *viral load*), gdje će se kao granična vrijednost (engl. *cut off*) uzeti koncentracija virusa od 10^4 kopija DNA bokavirusa po ml.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje je obuhvatilo 957 djece hospitalizirane zbog akutne respiratorne infekcije u Klinici za dječje bolesti Zagreb (KDB Zagreb) i Općoj bolnici Karlovac (OB Karlovac) u razdoblju od svibnja 2017. do ožujka 2021. U istraživanje su uključena djeca u dobi do 18 godina hospitalizirana zbog sumnje na akutnu respiratornu infekciju virusne etiologije koja ne traje dulje od 5 dana pred prijem, postavljenu od strane kliničara na temelju kliničke slike i inicijalno učinjenih laboratorijskih parametara (CRP i leukociti). Na početku istraživanja za svako dijete su zabilježeni osnovni demografski podaci (dob i spol) te klinička dijagnoza. Za analizu podataka ispitanici su podijeljeni u četiri dobne skupine: mlađi od jednu godinu, od jedne do tri godine, od tri do pet godina te od pet i više godina.

Za svako dijete uključeno u studiju, na dan prijema sterilnim je setom namjenjenim za PCR testiranje (engl. *flocked swab*) uzet uzorak obriska nazofarinksa i ždrijela te stavljen u isti transportni medij UTM™ (Copan, Italija). Uzorci su do transporta čuvani na +4°C te čim prije dostavljeni u laboratorij (< 24 sata), a gdje su pohranjeni na -80°C do obrade.

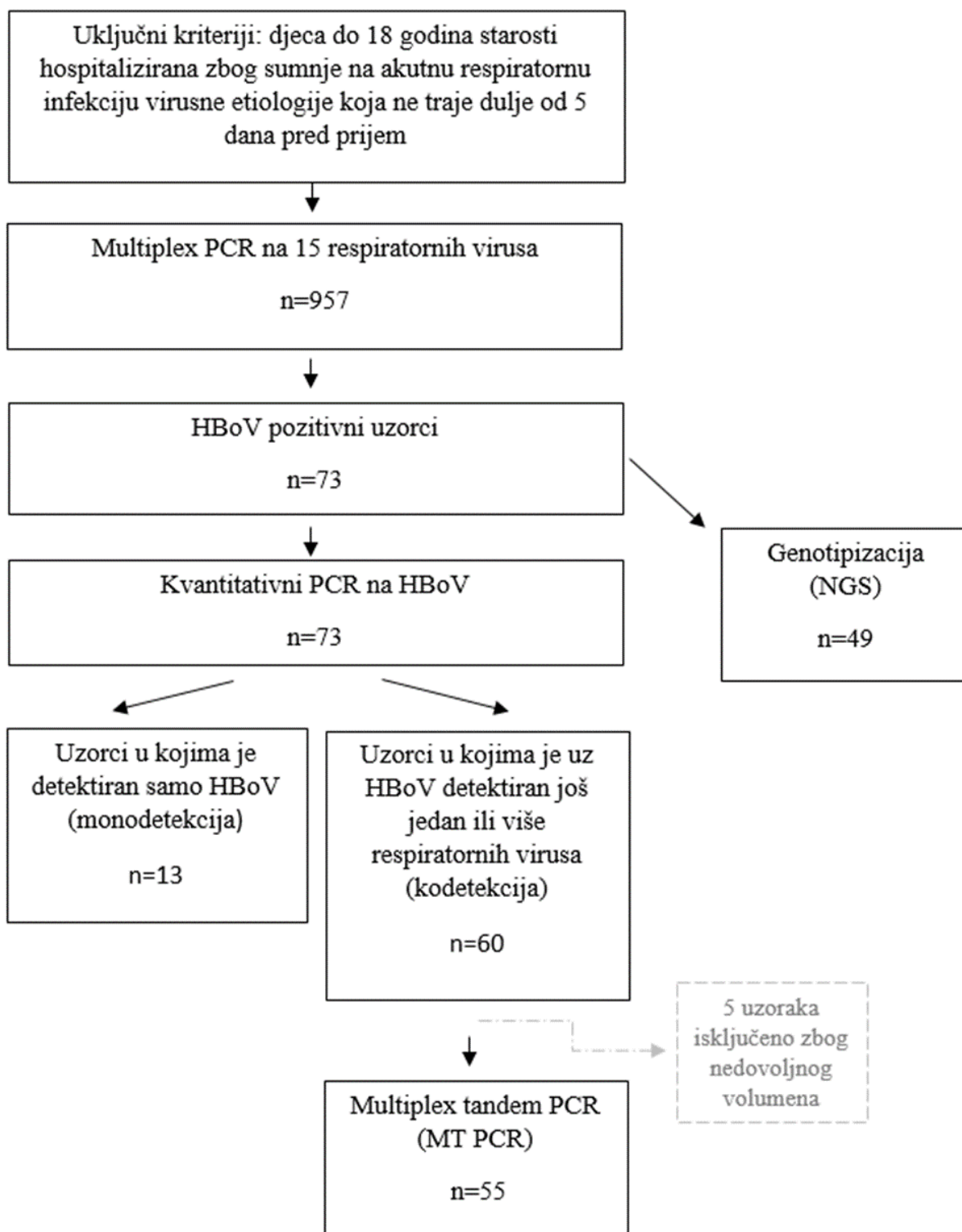
4.2. Etička odobrenja

Istraživanje je provedeno u sklopu istraživačkog projekta HRZZ RESPIVIRUS IP-2016-06-7556 pod nazivom „Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika“ (od engl. „*New and neglected respiratory viruses in vulnerable groups of patients*“), voditeljice prof. dr. sc. Sunčaniće Ljubin Sternak.

Studija je provedena prema smjernicama Helsinške deklaracije i odobrena od strane Etičkog odbora Nastavnog zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" (protokol broj 500-04/15-01/01; datum odobrenja 23. svibnja 2016.). Za svako dijete pribavljen je informirani pristanak roditelja/skrbnika, a istraživanje je dobilo potrebne etičke dopusnice svih ustanova u kojima je provedeno.

4.3. Metode virološke dijagnostike infekcije humanim bokavirusom

Tijek istraživanja grafički je prikazan na slici 6.



Slika 6. Prikaz tijeka istraživanja i korištenih metoda virološke dijagnostike

4.3.1. Izolacija virusne nukleinske kiseline

Ekstrakcija virusnih nukleinskih kiselina učinjena je korištenjem Ribospin™ vRD kita (Gene All Biotechnology, Seoul, Korea) iz 300 µl transportnog medija prema uputama proizvođača. Ovaj kit koristi tehnologiju staklenih vlakana (engl. *glass membrane technology*) i ispiranja pomoću pufera za lizu i vezivanje umjesto konvencionalne metode ekstrakcije pomoću alkohola ili fenola/kloroforma. Dobiveni produkti na kraju se ispiru nukleaza-slobodnom vodom te pohranjuju na +4°C za neposrednu analizu, a na -70°C ukoliko je potrebno duže čuvanje kako bi se očuvao integritet izoliranih nukleinskih kiselina, osobito RNA, koja je osjetljiva na djelovanje RNAza.

4.3.2. Multipleks PCR kojim se detektiraju nukleinske kiseline 15 respiratornih virusa

PCR kojim se detektiraju nukleinske kiseline 15 respiratornih virusa proveden je metodom multipleks RT-PCR-a upotrebom Seeplex® RV15 OneStep ACE Detection kita (Seegene, Seoul, Korea) na uređaju Thermal cycler GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Metoda se temelji na oligo tehnologiji nazvanoj DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide). Multipleks PCR i sinteza komplementarne DNA (cDNA) se provodi u tri različite tubice sa tri seta početnica (A, B i C). Svaki set sadrži početnice za pet virusa, što je prikazano u tablici 5. Početnice koje detektiraju virus influence A su dizajnirane tako da detektiraju sve podtipove virusa, uključujući H5N1 podtip i H1N1pdm09 podtip. Početnice za adenoviruse detektiraju većinu tipova iz grupe B, C i E te neke tipove iz grupe A i D.

Kit Seeplex® RV15 Onestep ACE Detection assay uključuje dvije interne kontrole: PCR kontrolu i WPC koje osiguravaju sigurnost da se cijeli proces odvija ispravno.

PCR kontrola se dodaje u setove A i B, a služi kako bi se provjerila prisutnost tvari koje mogu ometati PCR amplifikaciju. Druga kontrola se nalazi u setu C i naziva se kontrola cijelog procesa (od engl. *whole process control*, WPC), a detektira humanu RNazu P kao unutarnju kontrolu za provjeru cijelog eksperimentalnog procesa od ekstrakcije nukleinske kiseline do RT-PCR-a. Dodatno, kit sadrži 8-metoksipsoralen (8-MOP) za prekidanje aktivnosti kontaminirane DNA.

Amplifikacija je provedena na uređaju Thermalcycler GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uvjeti izvođenja RT PCR reakcije su prikazani u tablici 6.

Tablica 5. Prikaz virusa i kontrola koji su detektirani multipleks PCR-om na 15 respiratornih virusa

Set A	Set B	Set C
AdV	HCoV OC43	HBoV 1/2/3/4
HCoV 229/N163	HRV A/B/C	Flu B
PIV 1	RSV A	HMPV
PIV 2	RSV B	PIV 4
PIV 3	Flu A	HEV
PCR interna kontrola	PCR interna kontrola	WPC

AdV, humani adenovirus; HCoV, humani koronavirus; PIV, virus parainfluenze; RSV, respiratorni sincicijski virus; Flu, virus influence; HBoV, humani bokavirus; HMPV, humani metapneumovirus; HEV, humani enterovirus; WPC, kontrola cijelog procesa

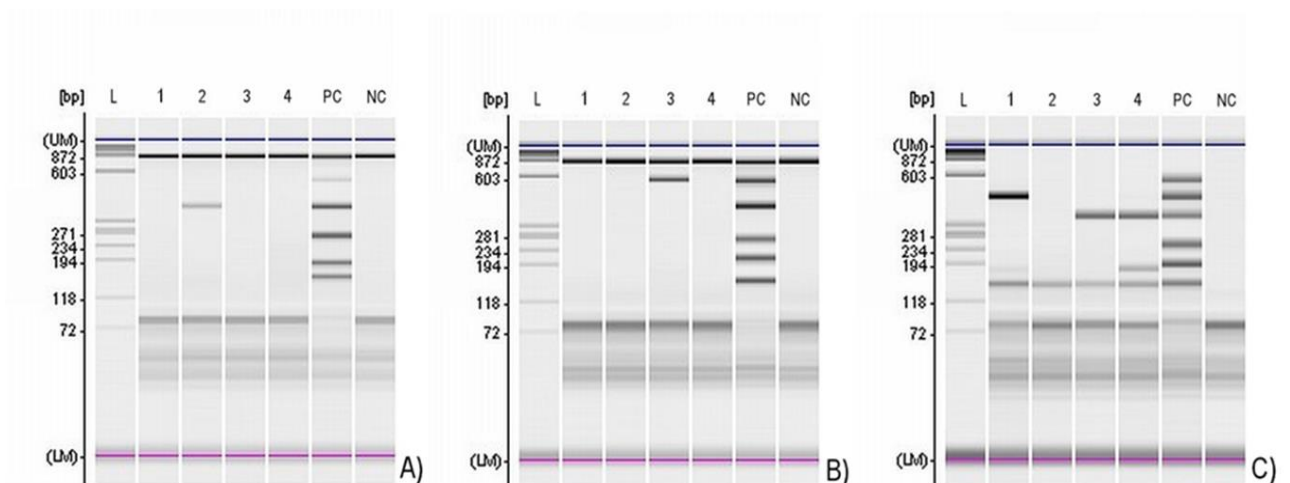
Tablica 6. Program za izvođenje RT PCR reakcije za multipleks PCR na 15 respiratornih virusa

Korak	Broj ciklusa	Temperatura (°C)	Trajanje (min)
1	1	50	30
2	1	94	15
3	45	94	0.5
		60	1.5
		72	1
4	1	72	10

Produkti amplifikacije detektirani su metodom mikročip elektroforeze na uređaju MCE[®]-202 MultiNA (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji uključuje softversku analizu u formi elektroferograma i virtualnog gela (slika 7 i 8).



Slika 7. Uređaj za mikročip elektroforezu MCE[®]-202 MultiNA (Shimadzu, Kyoto, Japan)



Slika 8. Primjer virtualnog gela sa A, B i C setovima početnica za četiri analizirana uzorka.

Uzorak 1. negativan je u A i B setu, a pozitivan u C setu na virus influence B.

Uzorak 2. pozitivan je u setu A na HCoV 229/NL63, a negativan u setovima B i C.

Uzorak 3. negativan je u setu A, a pozitivan u setu B na HCoV OC43 i pozitivan u setu C na HMPV.

Uzorak 4. negativan je u A i B setu, a pozitivan u setu C na HMPV i HEV.

Nakon detekcijskog koraka PCR produkti su izloženi UV svjetlu (365nm) kroz 20 minuta kako bi se spriječila križna kontaminacija.

4.3.3. Kvantitativni PCR HBoV

Za uzorke u kojima je multipleks PCR metodom dokazan HBoV proveden je kvantitativni PCR na uređaju Lightcycler® 480 Real-time PCR Instrument (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) korištenjem kita LightMix® Modular Bocavirus (Roche, TIB Molbiol) te je određena količina DNA virusa u uzorku (od engl. *viral load*).

U testu su korištene PCR početnice BoF i BoR te hidrolizacijska proba BoP koje se specifično vežu za NP-1 gen HBoV, a prikazane su u tablici 7 (115).

Tablica 7. Prikaz korištenih početnica i probe za kvantitativni PCR na HBoV

Virus	Sekvenca (5' → 3')	Ciljni gen
HBoV	F: GGA AGA GAC ACT GGC AGA CAA	Nestrukturni protein 1 (NP-1)
	R: GGG TGT TCC TGA TGA TAT GAG C	
	Proba: FAM- CTG CGG CTC CTG CTC CTG TGA T -BHQ2	

U tablici 8 prikazan je korišteni protokol na uređaju Roche 480

Tablica 8. Programiranje uređaja Roche 480

PCR korak	<i>Denaturacija</i>	<i>Umnažanje</i>			<i>Hlađenje</i>
<u>Parametar</u>					
Analitički program	ništa	Kvantifikacijski način			ništa
Broj ciklusa	1	45			1
<i>Target</i> (°C)	95	95	60	72	40
<i>Hold</i> (hh:mm:ss)	00:05:00	00:00:15	00:00:15	00:00:15	00:00:30
<i>Ramp rate</i> (°C/s) 96	4,4	4,4	2,2	4,4	1,5
<i>Ramp rate</i> (°C/s) 384	4,6	4,6	2,4	4,6	2,0
<i>Aquisition mode</i>		ništa	pojedinačno	ništa	ništa

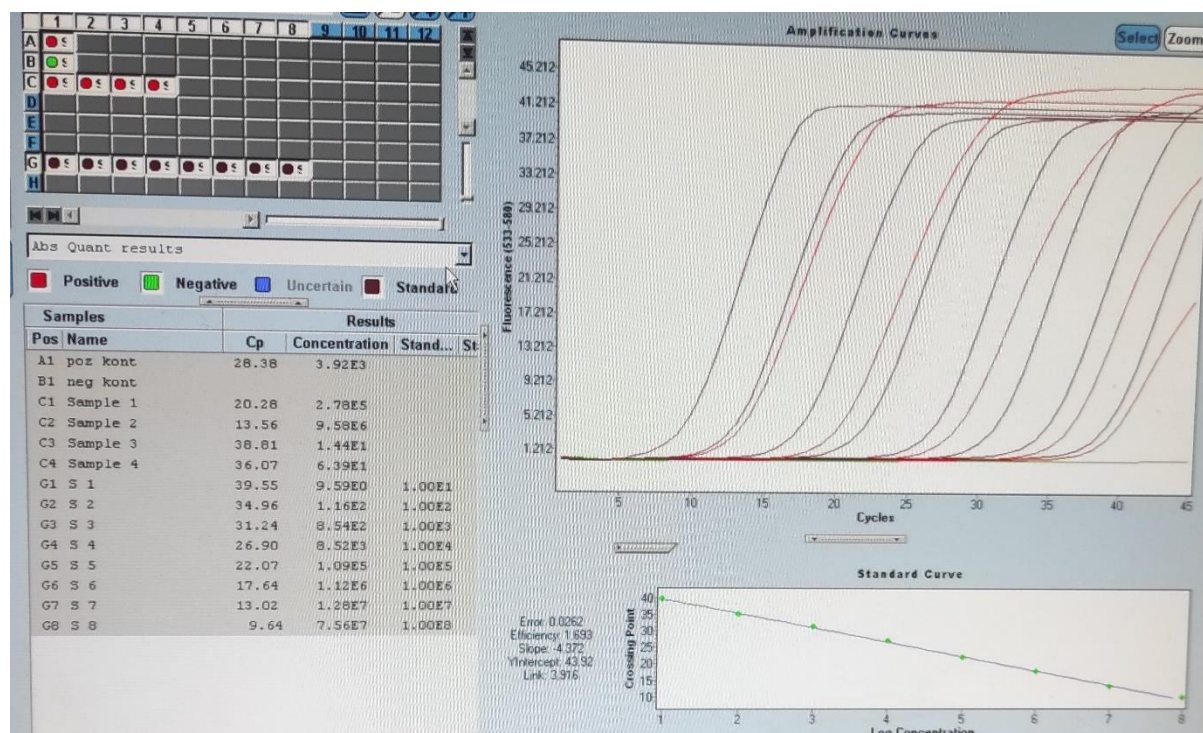
Reakcijska mješavina pripravljena je prema uputama proizvođača korištenjem Roche LightCycler® Multiplex DNA Master-a. U tablici 9 su prikazane korištene količine reagensa.

Tablica 9. Priprema reakcijske mješavine za kvantitativni PCR na HBoV

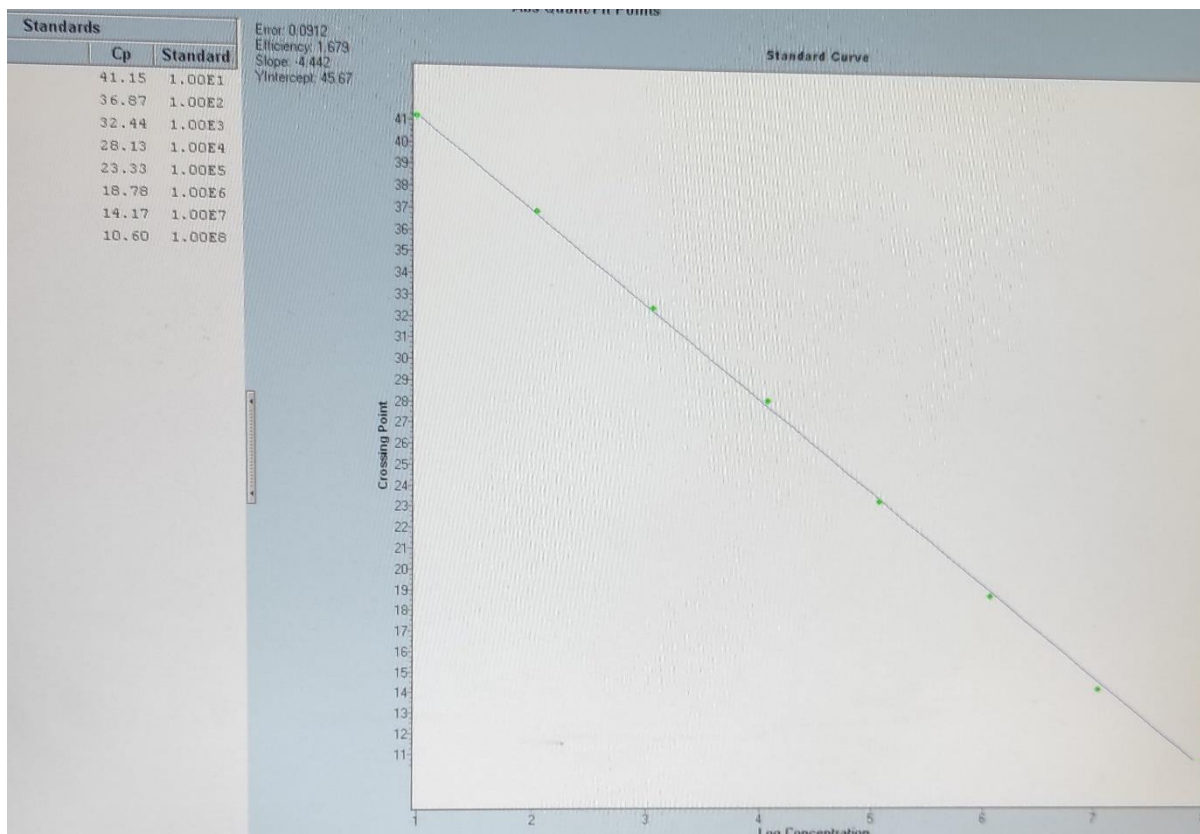
Za upotrebu s Roche LightCycler® Multiplex DNA Master-om	
Za 5 µl ekstrakta	Komponenta
10,4 µl	PCR voda (iz Roche Master kita)
0,5 µl	Mješavina reagensa koja sadrži početnice i probe (PSR*)
4,0 µl	Roche Master
<u>14,9 µl</u>	<u>volumen reakcijske mješavine</u>

* PSR- od engl. *parameter specific reagents*

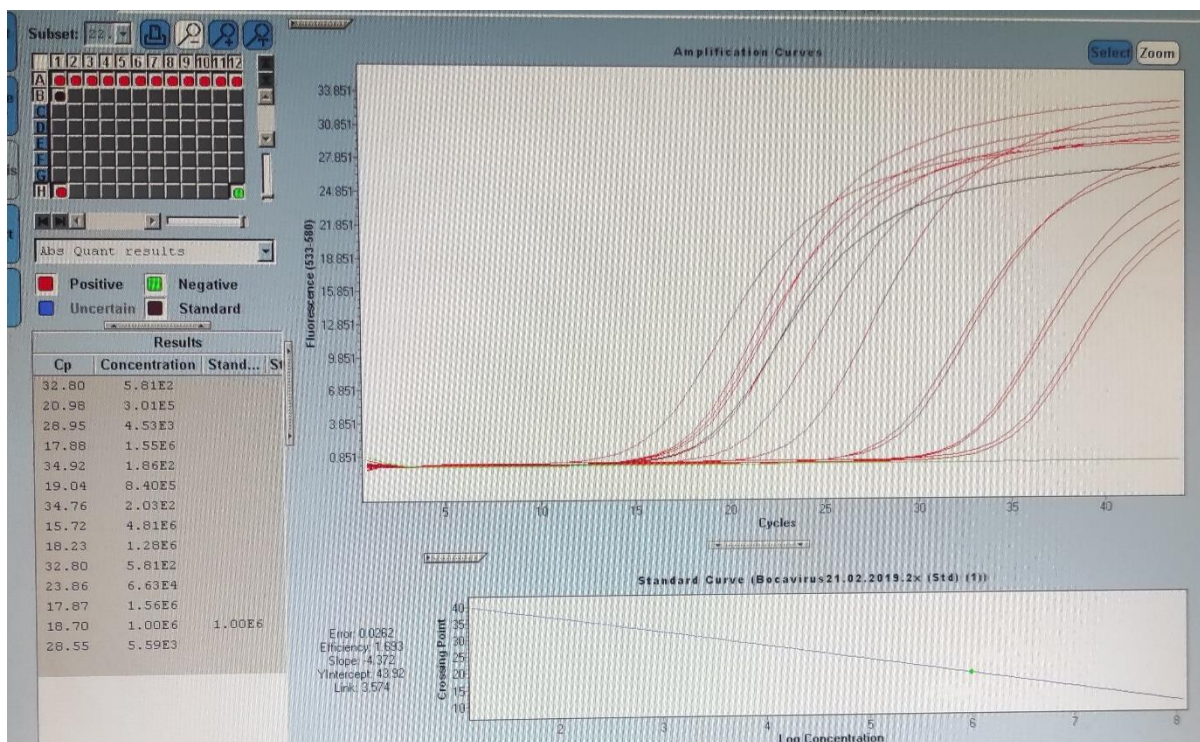
Standardne krivulje izrađene su korištenjem liofiliziranih standarda poznate koncentracije HBoV u rasponu od 10 do 10⁸ kopija/ml koji su otopljeni u PCR- ultra čistoj vodi. Dilucijski niz prikazan je na slici 9, a izgled dobivene standardne krivulje na slici 10. Na slici 11 prikazani su rezultati kvantitativnog PCR-a jednog dijela testiranih uzoraka.



Slika 9. Rezultati kvantifikacije dilucijskog niza standarda poznatih koncentracija (od 10 do 10⁸ kopija/ml)



Slika 10. Izgled dobivene standardne krivulje. Korišteni standardi od 10 do 10^8 kopija/ml

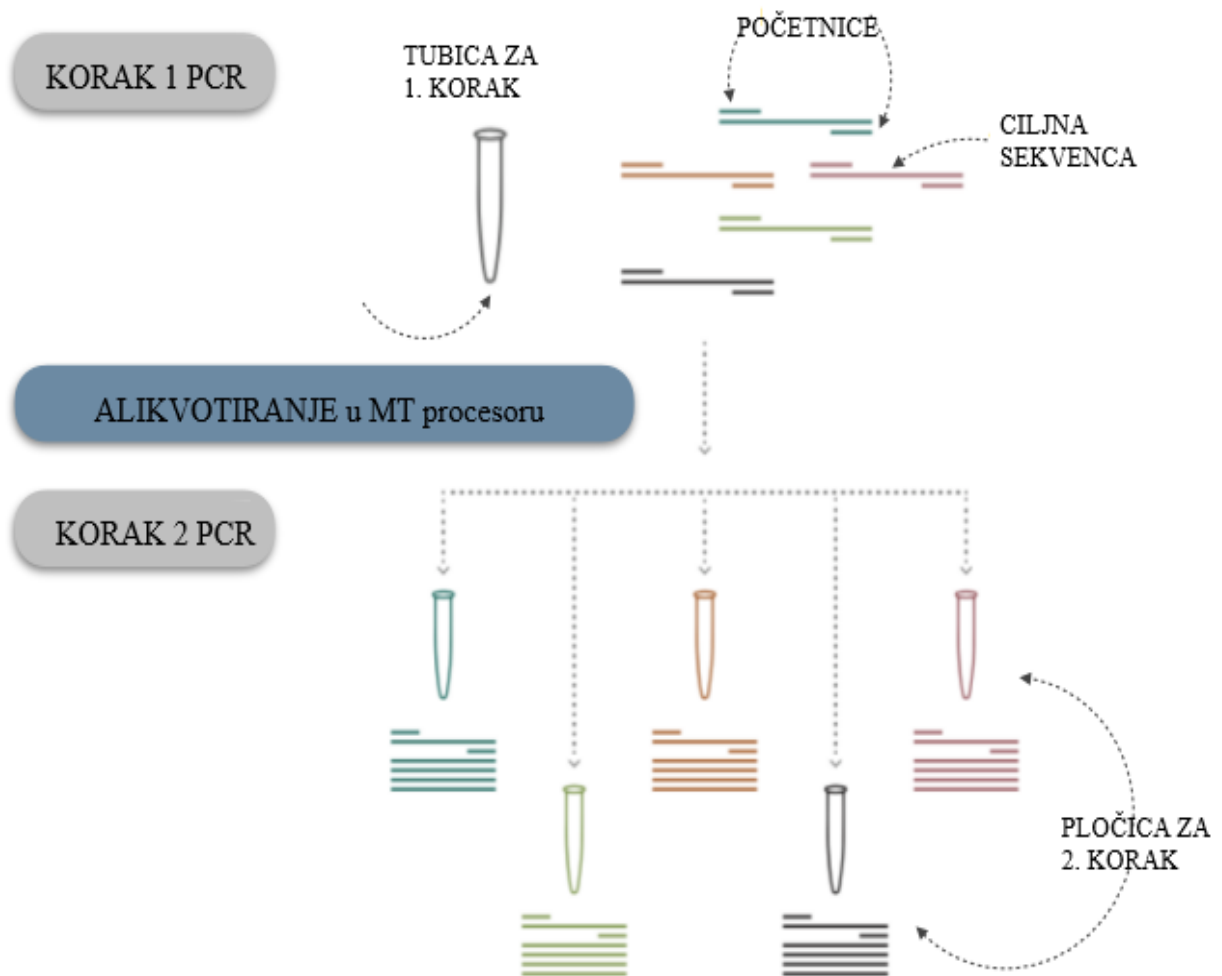


Slika 11. Prikaz rezultata kvantitativnog PCR-a za dio testiranih uzoraka

4.3.4. Multipleks tandem PCR

Uzorci u kojima je otkriven HBoV u kombinaciji s barem još jednim respiratornim virusom (koinfekcija/kodetekcija) dodatno su analizirani metodom multipleks tandem PCR-a (MT-PCR) (116). MT-PCR nije tradicionalna kvantitativna metoda jer ne može odrediti koncentraciju virusa (engl. *viral load*) tj. broj virusnih kopija po ml, ali može pružiti informacije o količini svakog pojedinog virusa uspoređujući ih sa standardom, odnosno umjetnom kontrolom nazvanom SPIKE, pri čemu rezultate prezentira u obliku intenziteta signala umnoženog odsječka genoma virusa označenog s 1 do 5 zvjezdica.

Riječ je o metodi ugniježđenog (engl. *nested*) PCR-a koji koristi dva uzastopna PCR koraka. Uzorak (izolirana nukleinska kiselina) stavlja se u tubicu za 1. korak u kojoj se nalaze svi reagensi potrebni za prvi PCR. To je kratka amplifikacija od 18 ciklusa koja sadrži početnice homologne za sve gene ponuđene u testu. Svaki par početnica specifičan je za jednu metu. Produkti dobiveni u prvom PCR-u (korak 1) prebacuju se u pločicu u kojoj se odvija korak 2. U pločici se nalaze odvojene početnice za svaki ciljani gen koji su dizajnirani tako da su "ugniježđeni unutar" početnica koraka 1, što povećava osjetljivost i specifičnost ispitivanja. Nakon toga pločica se prebacuje u analizator u kojem se odvija PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) (slika 12).



Slika 12. Princip multipleks tandem PCR metode

Analiza je provedena na uređaju High-Plex 24 System (AusDiagnostics, Mascot, NSW, Australia) (slika 13), korištenjem *Respiratory viruses 16 well* testa (AusDiagnostics, Mascot, NSW, Australia) koji detektira ciljne sekvence 16 respiratornih virusa: influenza A, influenza B, RSV, rinovirus/enterovirus, enterovirus, humani bokavirus, humani virusi parainfluenze 1-4, humani parehovirus, humani adenovirusi, humani koronavirusi i humani metapneumovirus (tablica 10).



Slika 13. Komponente uređaja High-Plex 24 System: 1. Kompjuter sa softverskim programom
2. MT Procesor, 3a. MT Analizator, 3b. Roche Analyser LC480 (opcionarno)

Test sadrži nekoliko kontrola: pozitivnu i negativnu kontrolu, dvije endogene kontrole (engl. *Sample Adequacy Control* i *Human DNA Control*) koje služe za kontrolu ekstrakcije nukleinskih kiselina, ali i kontrolu uzorka jer ciljaju referentni ljudski gen, odnosno indiciraju prisutnost ljudske DNA u uzorku. Dodatna kontrola nazvana *SPIKE* potpuno je umjetna sekvenca koja služi za kontrolu inhibicije reakcije i rada aparata kako bi se moglo procijeniti funkcionira li cijeli proces prema zadanim parametrima. *SPIKE* je dizajniran tako da nema križne reaktivnosti s dijagnostičkim metama ili testovima. U slučaju da je *SPIKE* kontrola inhibirana, uzorak sadrži inhibicijske tvari ili su uvjeti reakcije bili suboptimalni.

Tablica 10. Virusi i kontrole detektirani testom Respiratory viruses 16 well (AusDiagnostics, Mascot, NSW, Australia)

Komponente testa	Rezultat testa
Influenca A	Virus influenza A (uključuje H1, H3, H5 i H7)
H1	Virus influenza A serotip pdH1N1
H3	Virus influenza A serotip HA (uključuje H3N2)
Influenca B	Virus influenza B (linije Yamagata i Victoria)
RSV	Respiratorni sincicijski virus (uključuje i diferencira tip A i B)
RV/EV	Rinovirus (tipovi A, B i C) i enterovirus (tipovi A, B, C, D)*
HBoV	Humani bokavirus 1
PIV 1-3	Humani parainfluenca virus (tipovi 1, 2, 3)
PIV 4	Humani parainfluenca virus 4A i 4B
Parehovirus	Humani parehovirus (uključuje tipove 1-8)
AdV	Humani adenovirus (uključuje grupe B, C, E i neke A, D; ne uključuje AdV21)
HCoV	Humani koronavirusi (detektira α -koronaviruse i podgrupu β -koronavirusa)
HMPV	Humani metapneumovirus (uključuje sve tipove A i B)
Sample Adequacy	Humani referentni gen za kontrolu uzorka
SPIKE	Umjetna sekvenca za kontrolu testa

4.3.5. Genotipizacija humanog bokavirusa

Za sekvenciranje nove generacije (od engl. *Next Generation Sequencing*, NGS), DNA virusna ponovno je ekstrahirana iz 400 μ L uzorka koristeći Quick-DNA Viral Kit (Zymo Research, Irvine, SAD) i slijedeći upute proizvođača (117). Izolirana DNA podvrgnuta je PCR amplifikaciji pomoću Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, SAD), bilo umnažanjem gotovo potpunog genoma pomoću početnice B_fw i B_rev

(koji pokrivaju položaje 1-5212, prema sekvenci KP710213), ili kombinacije početnica koje generiraju tri fragmenta koji se preklapaju (tablica 11).

Tablica 11. Korištene početnice i uvjeti PCR reakcije*

Početnice	Sekvenca (5' – 3')	Položaj**	Temperatura spajanja (engl. <i>annealing</i>) (°C)
B_fw	GCCGGCAGACATATTGGATT	1 – 20	63
B1_Rev	GCCACCAACAACCGCGTAGAT	1789 – 1809	
B2_Fw	TTACGGGCCTGCYTCAACAG	1515 – 1534	61
B2_rev	CTGGATCCAATAATTCACCAA	3282 – 3303	
B3_fw	CATGGAAGCAGATGCCTCC	3045 – 3063	63
B_rev	CGGCTAGGTTTCGAGACGG	5195 – 5212	

* Za amplifikaciju cijelog genoma korištene su početnice B_fw i B_rev, uz 10 µL izolirane DNA. Smjese reakcije PCR-a sadržavale su 1× Phusion HF pufer (New England Biolabs, Ipswich, SAD), 200 µM dNTP mješavinu, 0.5 µM svake početnice i 1 U Phusion polimeraze (New England Biolabs, Ipswich, SAD). PCR uvjeti bili su: 98 °C tijekom 5 minuta, 35 ciklusa od 98 °C/10 s, 63 °C/30 s, 72 °C/5 minuta, a zatim konačno produženje (elongacija) na 72 °C tijekom 10 minuta. Za amplifikaciju preklapajućih parova, temperatura spajanja (engl. *annealing*) prilagođena je prema tablici navedenoj iznad, a u reakciji se koristilo 5 µL izolirane DNA. PCR uvjeti bili su: 98 °C tijekom 5 minuta, 35 ciklusa od 98 °C/10 s, Tann °C/30 s, 72 °C/1 min 30 s, a zatim konačno produženje na 72 °C tijekom 10 minuta.

**Navedeno se odnosi na GenBank sekvencu KP710213.

Fragmenti su potom odvojeni na 1 % agaroznim gelovima, izrezani i pročišćeni s pomoću Nucleospin Gel i PCR Clean up Kita (Macherey-Nagel, Dueren, Njemačka) te kvantificirani QuantiFluor® ONE dsDNA kitom (Promega, Madison, SAD). Biblioteke su pripremljene s pomoću NEBNexta Quality Ultra II FS DNA Library prep kita (New England Biolabs, Ipswich, SAD) provjereno pomoću High Sensitivity DNA Kita za 2100 Bioanalyzer system (Agilent, Santa Clara, SAD). Biblioteke su objedinjene i sekvencirane pomoću MiniSeq Mid Output Kita (2 × 150 pair end reads, Illumina, San Diego, SAD).

4.3.5.1. Analiza sekvence

Kvaliteta neobrađenih očitavanja (engl. *reads*) procijenjena je s FastQC v0.11.8 i podvrgnuta skraćivanju, uklanjanju adaptera i uklanjanju kratkih očitavanja pomoću BBDuk (od engl. *Decontamination Using Kmers*) unutar paketa BBTools (*Bestus Bioinformaticus*). Očitavanja sparenih krajeva su usklađena s HBoV 1 izolatom HZ1403 (acc. br. KP710213), HBoV 2 sojem W153 (acc. br. EU082213), HBoV 3 sojem W471 (acc. br. EU918736) i HBoV 4 sojem

HBoV4-NI-385 (acc. br. NC_012729), koristeći Bowtie2 v2.4.2 (118). Za daljnju usporedbu i dobivanje konsenzusnih sekvenci (engl. *alignment and consensus calling*) korišten je Samtools v1.12. Poravnanja niže pokrivenosti sastavljena su *de novo* pomoću Velvet (119, 120), a kontinuirani nizovi sastavljeni od skupa fragmenata (od engl. *contig*) su pretraživani u bazi podataka pomoću BLAST-a (engl. *The Basic Local Alignment Search Tool*).

4.3.5.2. Filogenetska analiza

Nukleotidne sekvence sojeva HBoV 1 dobivene su iz GenBank i korištene za usporedbu i izradu filogenetskih stabala. U analizu su uključene sekvence izvan skupine (engl. *outgroup*) koje pripadaju genotipovima HBoV 2, HBoV 3 i HBoV 4, prethodno opisanim u literaturi. Usporedba je izvedena pomoću MAFFT-a (od engl. *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (121) i ručno uređena pomoću programa AliView (122). Filogenetska stabla generirana su korištenjem metode najveće vjerojatnosti pomoću softvera Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v6.06. (123), prema najprikladnijem modelu nt supstitucije određenom pomoću jModeltest v2.1.4. (124). *Bootstrap* vjerojatnosti za 1000 ponavljanja izračunate su kako bi se ocijenile procjene pouzdanosti. Konsenzusne sekvence HBoV sojeva dobivene u ovoj studiji pohranjene su u GenBank pod acc. Br. MZ468522-MZ468550. 2.6.

4.3.5.3. Analiza evolucijske stope i rekombinacije

Evolucijske stope procijenjene su pomoću Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) pristupa implementiranog u Beast v1.8.2. (125), prema najprikladnijem modelu koji je odabran pomoću jModeltest 2.1.4.

Evolucijske stope izračunate su korištenjem relaksiranog (lognormalnog nekoreliranog) modela molekularnog sata. Uzorci su provedeni za najmanje 10 milijuna MCMC lanaca, s uzorkovanjem svakih 1000 generacija. Konvergencija je procijenjena na temelju efektivne veličine uzorka pomoću programa Tracer v1.5. nakon 10 % sagorijevanja, a prihvaćane su samo vrijednosti iznad 200. Nesigurnost procjena je naznačena 95%-tnim intervalima najveće posteriorne gustoće (HPD). Događaji rekombinacije procijenjeni su korištenjem Recombination Detection Program v4 s različitim metodama analize rekombinacije (RDP, Bootscan, MaxChi, Chimaera, Siscan i 3Seq). Za rekombinacijsku analizu uzete su u obzir samo pune kodirajuće regije.

4.4. Kliničko-laboratorijski podaci

Klinički podaci prikupljeni su retrospektivno iz povijesti bolesti uvidom u otpusno pismo svakog djeteta pozitivnog na HBoV. Zabilježeni su podaci o komorbiditetima, otpusna dijagnoza, laboratorijski parametri upale (CRP i leukociti) na dan prijema bolesnika, podaci o rutinskoj mikrobiološkoj i radiološkoj obradi tijekom hospitalizacije te tijekom liječenja, uključujući potrebu za nadomjesnim liječenjem kisikom, antimikrobno liječenje, potrebu za bronhodilatatorom, kortikosteroidima, liječenje u jedinici intenzivnog liječenja i potrebu za mehaničkom ventilacijom te duljinu hospitalizacije. Zasićenost kisika u perifernoj arterijskoj krvi mjerena je pulsni oksimetrom.

Bakteriološka obrada provedena je standardnim metodama uzgoja na obogaćenim hranjivim podlogama. Izolacija *Streptococcus pyogenes* iz uzorka dobivenog obriskom ždrijela rađena je na krvnom agaru s dodatkom 5 % konjske krvi, a identifikacija bacitracinskim testom i testom aglutinacije. Izolacija bakterija iz nazofarinksa rađena je na krvnom agaru s dodatkom 5 % konjske krvi uz dodatak stafilokokne crte. Kod djece čija je težina kliničke slike to zahtijevala, uzeti su uzorci krvi za hemokulture koje su inkubirane u automatiziranim uređajima BacT/ALERT® 3D Dual-T, Biomerieux (OB Karlovac) i BD Bactec Touch (u razdoblju do 2019. godine) i BacT/ALERT® 3D, Biomerieux (od 2019. godine) u KDB Zagreb. Nakon detektiranog porasta, uzorci su inokulirani na krvni i čokoladni agar, a porasle bakterije identificirane klasičnim bakteriološkim metodama uz izradu antibiograma. Uzorci urina su sađeni na krvni agar, a porasle bakterije identificirane klasičnim biokemijskim metodama uz izradu antibiograma.

4.5. Statistička obrada

Na početku istraživanja izračunata je potrebna veličina uzorka. Uz očekivanu prevalenciju HBoV od 6,3 %, potrebnu snagu testa od 80 %, razinu značajnosti od 5 % te ograničenjem interval pouzdanosti na +/- 1 %, prema formuli $n = \frac{Z^2 P (1-P)}{d^2}$ (gdje je Z=0,8, P= 0,063, d=0,01), potreban broj je 378 ispitanika.

Rezultati su prikazani tablično i grafički. Korištena je deskriptivna statistika kako bi se izračunale osnovne statističke mjere poput srednje vrijednosti, standardne devijacije, medijana, interkvartilnog raspona te minimalne i maksimalne vrijednosti za svaku varijablu. Vizualizacija podataka putem histograma korištena je kako bi se procijenila usklađenost

distribucije promatranih varijabli s teoretskom normalnom distribucijom. Trendovi prevalencije pojedinog virusa po dobnim skupinama analizirani su korištenjem grafičkog prikaza pojavnosti pojedinog virusa u različitim dobnim skupinama te dodatkom linije trenda kako bi se vizualno uočio trend prevalencije.

Za ispitivanje statistički značajnih veza između dvije kategoričke varijable korišten je Pearsonov χ^2 test i Fisherov egzaktni test, ovisno o veličini uzorka. Za statističku značajnost uzeta je p-vrijednost manja od 0,05.

Za analizu nezavisnih skupina podataka koji nisu normalno distribuirani korišten je Mann-Whitney test, neparametrijski test koji omogućuje usporedbu medijana između dvije neovisne skupine.

Kako bi se istražio linearni odnos između dvije kontinuirane varijable, korišten je Pearsonov test korelacije.

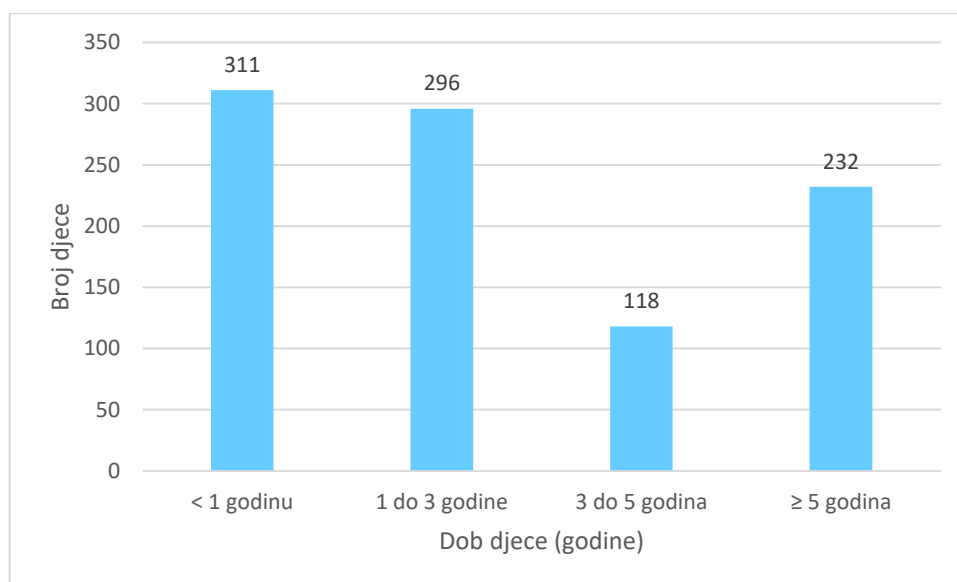
Dodatno je izračunat Spearmanov rang-korelacijski test kako biste istražili vezu između dvije varijable kada varijable nisu normalno distribuirane ili veza između njih nije linearna.

Sve analize provedene su korištenjem slobodno dostupnog statističkog softvera R (verzija 4.2.3).

5. REZULTATI

5.1. Ispitanici

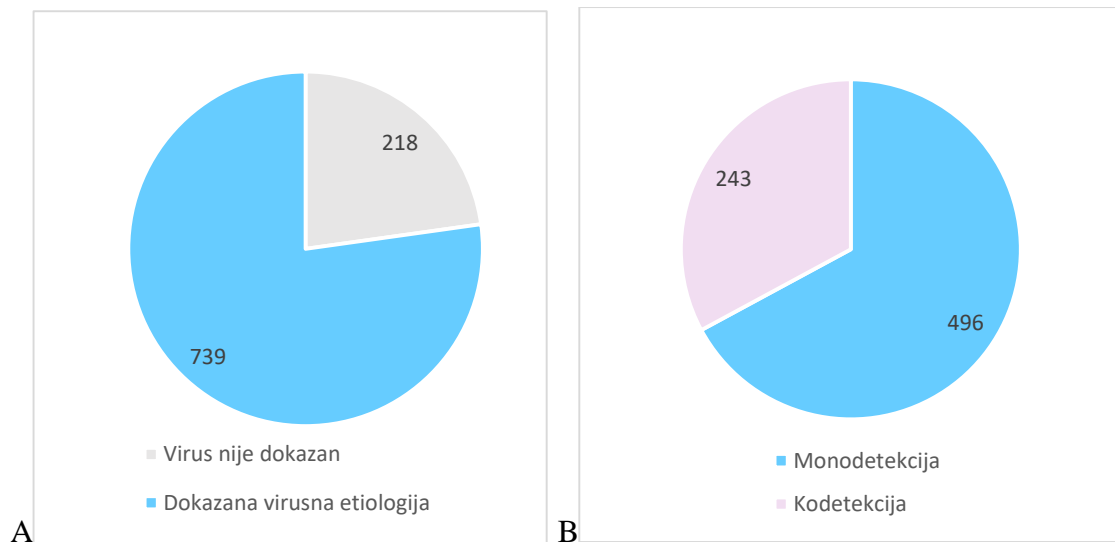
U razdoblju od svibnja 2017. do ožujka 2021. prikupljeno je 957 uzoraka, 736 iz KDB Zagreb te 221 uzorak iz OB Karlovac. Najviše testirane djece bilo je u dobi do jedne godine (n=311, 32,5 %), slijede djeca u dobi od jedne do tri godine (n=296, 30,9 %) dok je najmanji udio testirane djece imao između tri do pet godina (n=118, 12,3 %). Najmlađe testirano dijete imalo je jedan dan, najstarije 17,3 godine, a medijan testirane djece iznosio je 1,9 godina. Raspodjela testirane djece prema dobnim skupinama prikazana je na slici 14.



Slika 14. Raspodjela testirane djece prema dobnim skupinama (n=957)

5.2. Rezultati multipleks PCR-a na 15 respiratornih virusa

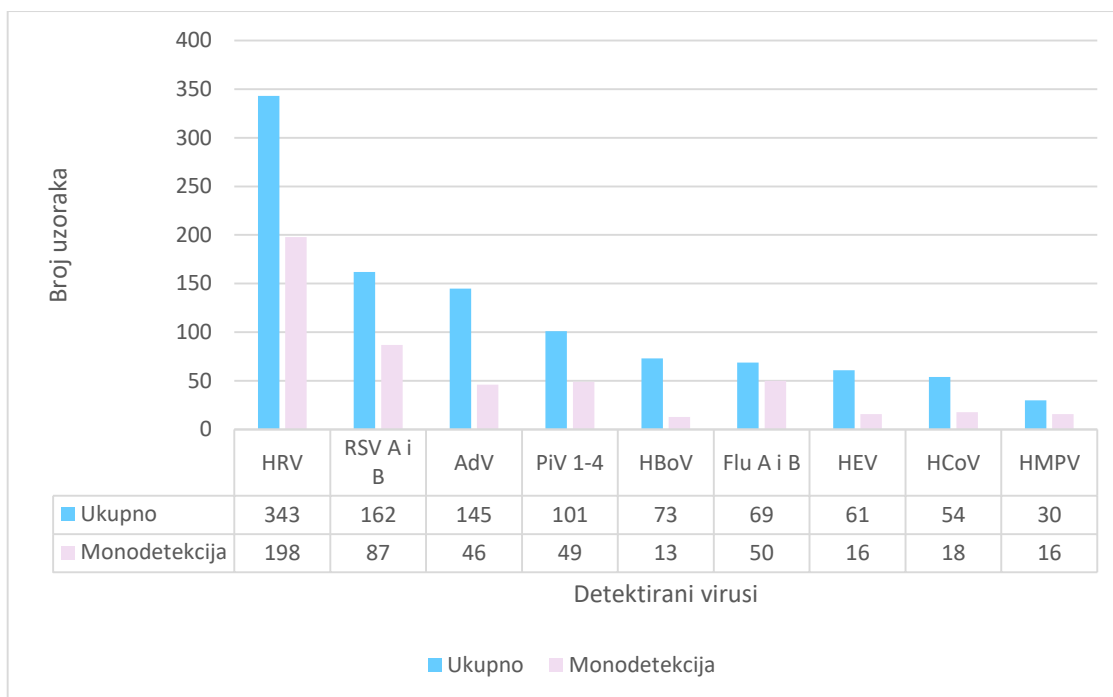
Virusna etiologija dokazana je u 77,2 % slučajeva (739/957), dok u 22,8 % (218/957) uzoraka nije dokazan niti jedan od testiranih virusa (slika 15A). U 496 uzoraka detektiran je jedan virus (monodetekcija), dok je u 32,9 % pozitivnih uzoraka (243/739) dokazano dva i više virusa (kodetekcija) (slika 15B).



Slika 15. Rezultati multipleks PCR-a za sve testirane uzorake (n=957) te udio monodetekcije u uzorcima s dokazanom virusnom etiologijom (n=739)

Najčešće detektirani virus bio je humani rinovirus (343/957, 35,8 %), a zatim je slijedio RSV A/B u 162 (162/957, 16,9%) uzorka te humani adenovirus u 145 uzoraka. Humani bokavirus bio je peti po učestalosti, nakon parainfluenca virusa (slika 16). Multipleks PCR metodom HBoV dokazan je u 73 uzorka (73/957), te je izračunata prevalencija od 7,6 %, uz 95%tni interval pouzdanosti (95% CI) 0,0594-0,093.

U 60 uzoraka HBoV dokazan je u kombinaciji s drugim virusom (82,2 %, 95% CI 0,7341-0,9097), a u 13 uzoraka bio je jedini dokazani virusni patogen (17,8 %, 95% CI 0,0903 - 0,2658). U usporedbi s drugim respiratornim virusima, HBoV je značajno češće detektiran u kombinaciji s drugim virusima od humanog rinovirusa, RSV-a, adenovirusa, virusa parainfluence, virusa influence i HMPV-a ($p < 0,05$), dok statistički značajna razlika u učestalosti kodetekcije nije uočena za enterovirus i sezonske koronavirus.



AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

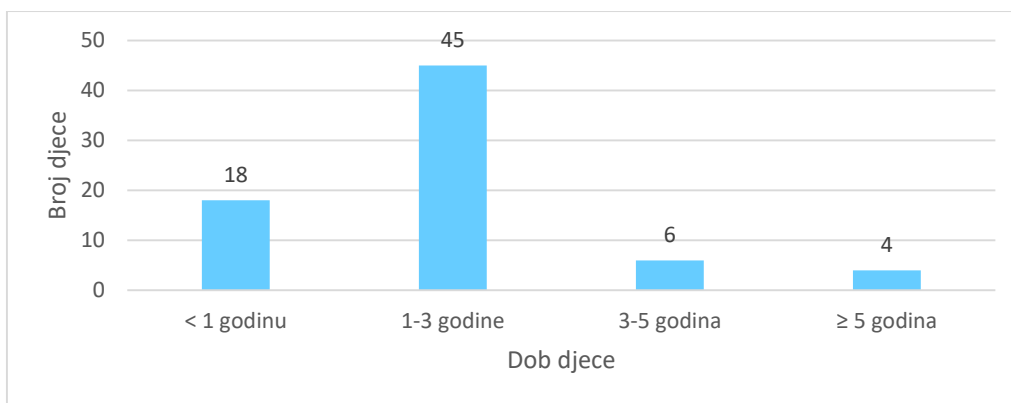
Slika 16. Prikaz rezultata detekcije 15 respiratornih virusa multipleks PCR metodom (n=957) prema vrsti dokazanog virusa te broj uzoraka u kojima je dokazani patogen detektiran kao jedini uzročnik (monodetekcija)

5.2.1 Dob djece s detektiranim humanim bokavirusom i drugim virusima

Medijan dobi djece kod koje je detektiran HBoV iznosio je 1,4 godina (donji IQR 1,017- gornji IQR 2,127), najmlađe dijete bilo je staro 7 dana, a najstarije dijete s detektiranim HBoV imalo je 15 godina.

Najveći broj djece s dokazanim HBoV bilo je u dobi od jedne do tri godine (45/73, 62 %), te je u toj dobnoj skupini njegova prevalencija iznosila 15,2 % (45/296). U dobnoj skupini od tri do pet godina prevalencija HBoV iznosila je 5,1 % (6/118), dok je prevalencija u djece mlađe od jednu godinu iznosila 5,8 % (18/311). Samo četvero djece s dokazanim HBoV bilo je starije od pet godina te je prevalencija u toj dobnoj skupini iznosila 1,2 % (4/232) (slika 17).

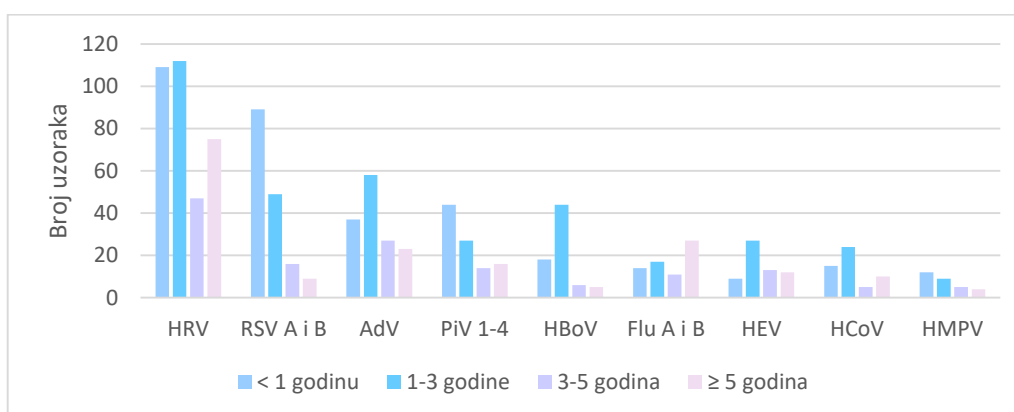
Provedena je statistička analiza značajnosti za dob Pearsonovim χ^2 testom, dobivena vrijednost p manja od 0,001 te utvrđeno da je prevalencija HBoV zavisna o dobnoj skupini na razini značajnosti od 5 %.



Slika 17. Raspodjela djece s dokazanim HBoV po dobnim skupinama

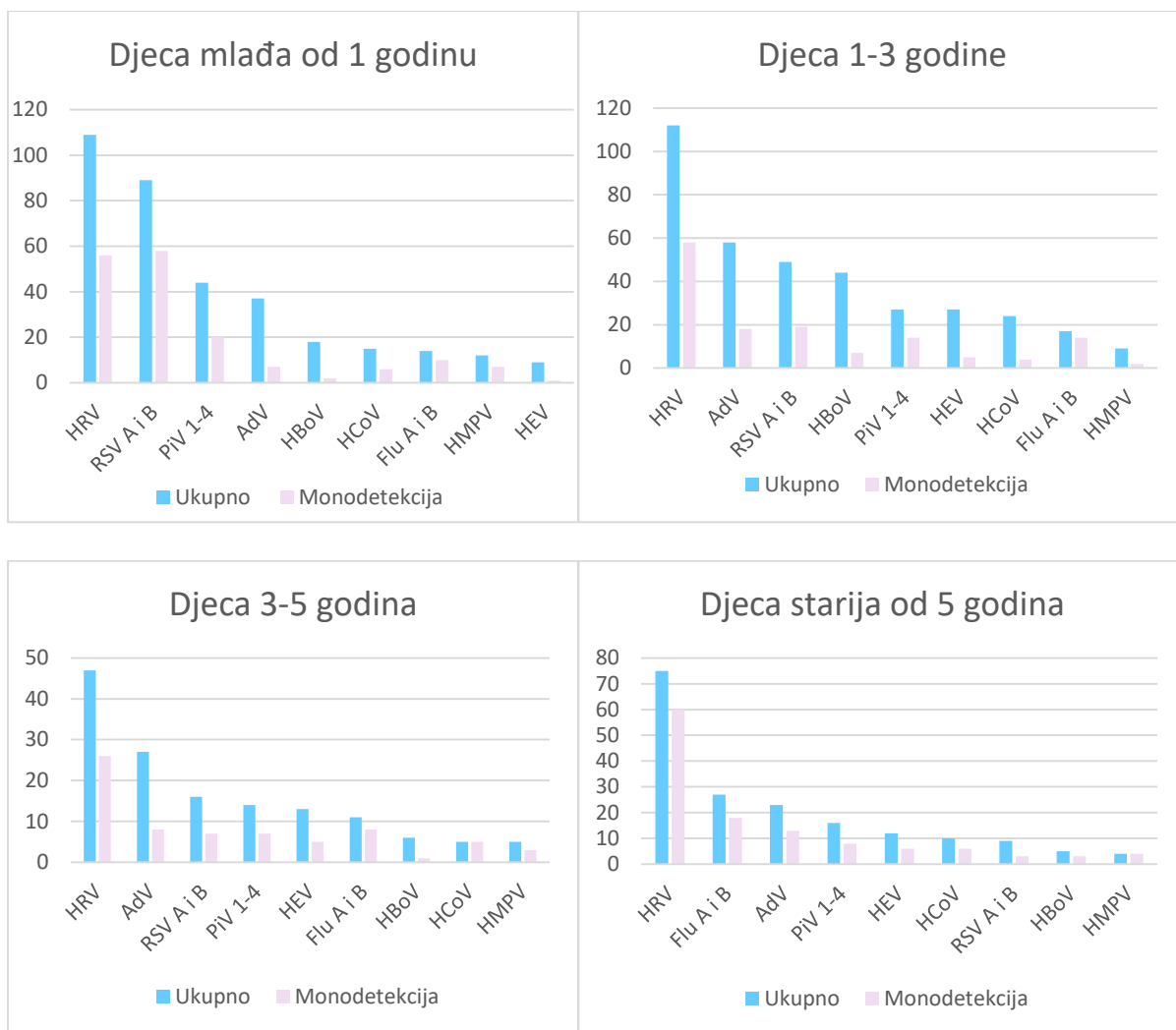
Učestalost detekcije drugih virusa, kao i njihov međusobni odnos, mijenjala se po dobnim skupinama, osim učestalosti humanog rinovirusa, koji je bio najčešće detektirani virus u svim dobnim skupinama, a prevalencija mu se kretala od 33,9 do 38,5 %. U djece mlađe od jednu godinu drugi najčešći virus bio je RSV A/B, koji je detektiran u gotovo trećine djece (90/311, 28,9 %), za razliku djece starije od pet godina gdje je prevalencije iznosila 3,9 % (9/232). U djece iznad pet godina drugi najčešći uzročnik bio je virus influenza A/B s prevalencijom od 11,2 % (26/232). Adenovirus je bio drugi najčešće dokazani virus u skupini od jednu do tri godine, s prevalencijom u toj dobnj skupini od 22,3 % (66/296).

Vrh pojavnosti pojedinih virusa s obzirom na dobnu skupinu prikazan je na slikama 18 i 19, a trend prevalencije prema dobi na slici 20. Najuočljiviji je pad prevalencije s dobi za RSV i PiV 1-4, te rast prevalencije za virus influenza A i B.



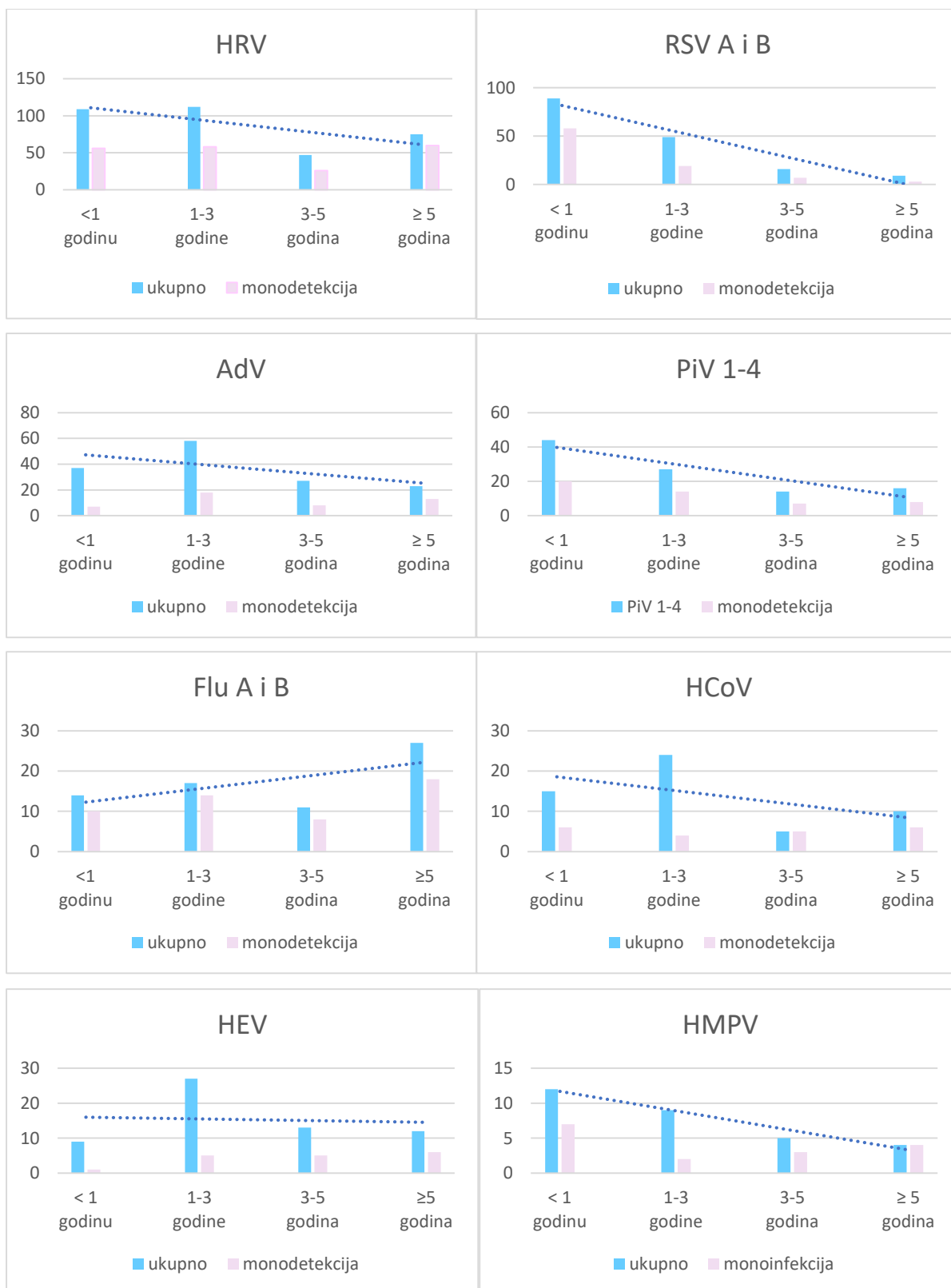
AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influenza A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluenze 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 18. Učestalost detekcije virusa po dobnim skupinama



AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 19. Prikaz najčešće detektiranih virusa u pojedinim dobnim skupinama djece s prikazom broja uzoraka s monodetekcijom pojedinog virusa

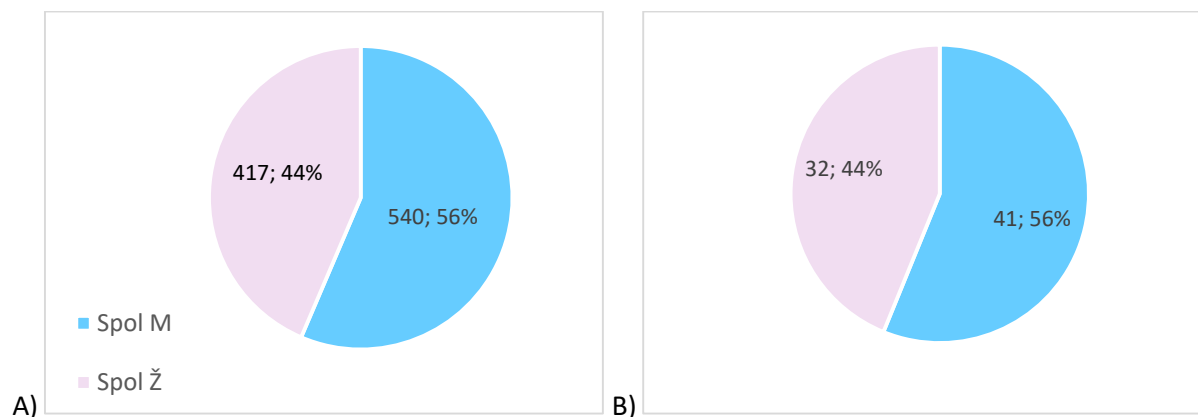


AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 20. Trend prevalencije pojedinog virusa prema dobi

5.2.2. Spol djece kod koje je dokazan HBoV

Testirano je 540 dječaka i 417 djevojčica. Među 73 djece s dokazanim HBoV bio je 41 dječak i 32 djevojčice (slika 21).

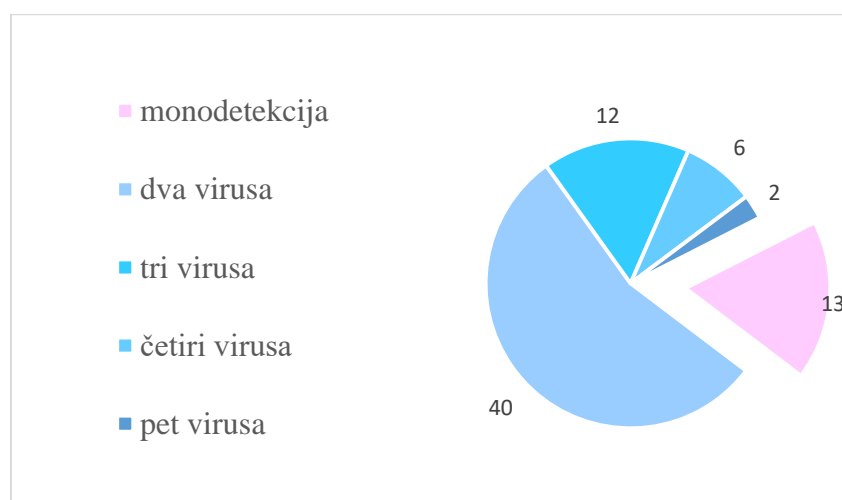


Slika 21. A) Raspodjela testirane djece po spolu (n=957); B) udio dječaka i djevojčica kod kojih je detektiran HBoV (n=73).

5.2.3. Učestalost kodetekcije HBoV s drugim respiratornim virusima

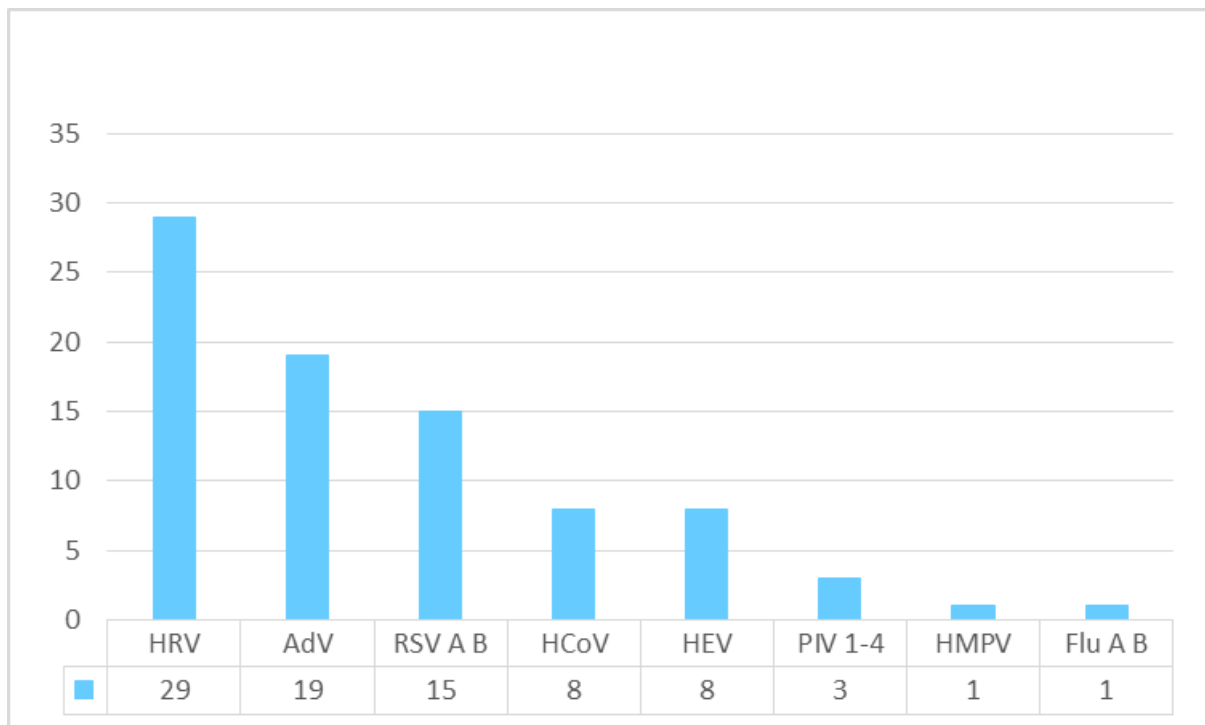
Koristeći multipleks PCR metodu, humani bokavirus otkriven je u 73 uzorka (73/957; 7,6 %), (95% CI 0,0595- 0,0931).

U 82,2 % slučajeva (n=60) HBoV je bio detektiran s barem još jednim virusom u uzorku (uz 95% CI 0,7342 -0,9097), a u 17,8 % slučajeva radilo se o monodetekciji (n=13), uz 95% CI 0,0903- 0,2658. U 40 uzoraka HBoV je detektiran s još jednim virusom, a u 20 uzoraka pozitivnih na HBoV detektirano je više od dva virusa (slika 22).



Slika 22. Učestalost kodetekcije HBoV s drugim virusom (n=60)

U uzorcima koji su bili pozitivni na HBoV najčešće kodetektirani virus bio je humani rinovirus koji je dokazan u 29 (29/60, 48,3 %) uzoraka, a zatim su slijedili adenovirus koji je detektiran u 19 (19/60, 31,7 %) uzoraka i RSV A ili B u 15 (15/60, 25 %) uzoraka (slika 23).



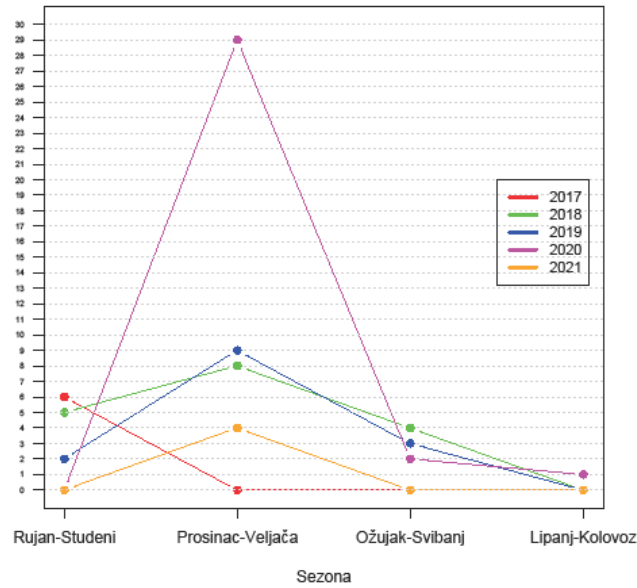
AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 23. Najčešće detektirani virusi u slučajevima kodetekcije HBoV (n=60)

5.2.4. Sezonska pojavnost HBoV i drugih respiratornih virusa

5.2.4.1. Sezonska pojavnost HBoV

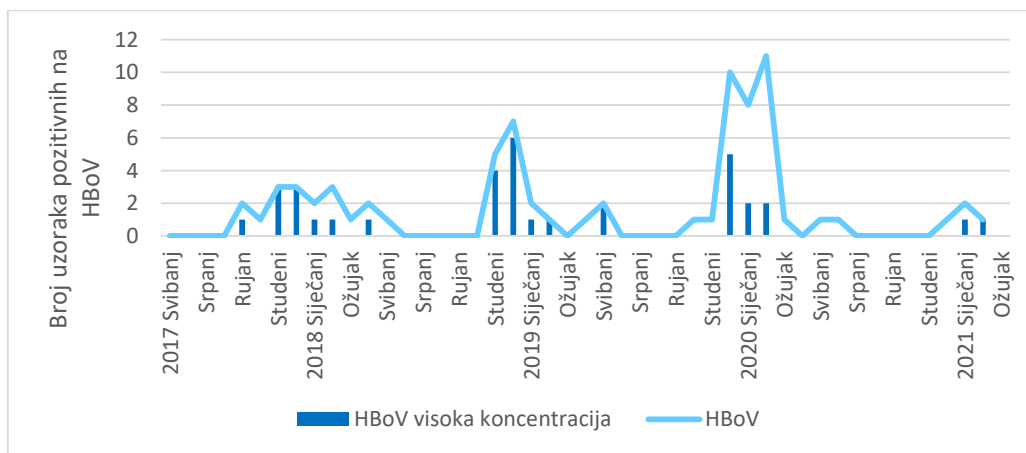
Vrhunac pojavnosti HBoV slijedio je obrazac sezonstva koji je karakterističan za sve respiratorne viruse. U cijelom promatranom razdoblju najviše detektiranih slučajeva bilo je u hladnijem dijelu godine, od studenog do ožujka, s vrhuncem između prosinca i veljače.



Slika 24. Prikaz pojavnosti HBoV po kvartalima

Kako bi se dobila jasnija slika, zbog malog broja uzoraka, prikazan je broj uzoraka po kvartalima za svaku promatranu godinu. Grafikon (slika 24) pokazuje jasan sezonski uzorak u incidenciji HBoV, s vršnom aktivnošću tijekom zimskih mjeseci i niskom tijekom ljetnih mjeseci. Vršna vrijednost za sve četiri promatrane sezone (2018., 2019. 2020. i 2021.) bila je u zimskom kvartalu, u razdoblju od prosinca do veljače. Podaci za 2017. godinu nepotpuni su jer je istraživanje započelo u svibnju 2017. godine.

Na slici 25 dodatno su istaknuti uzorci pozitivni na HBoV u kojima je kvantitativnim PCR-om utvrđena visoka koncentracija virusa. Većina uzoraka s visokom koncentracijom HBoV detektirana je u studenom i prosincu.



Slika 25. Uzorci u kojima je detektiran HBoV. Plavim stupcima prikazan je broj uzoraka u kojima je HBoV detektiran u visokoj koncentraciji.

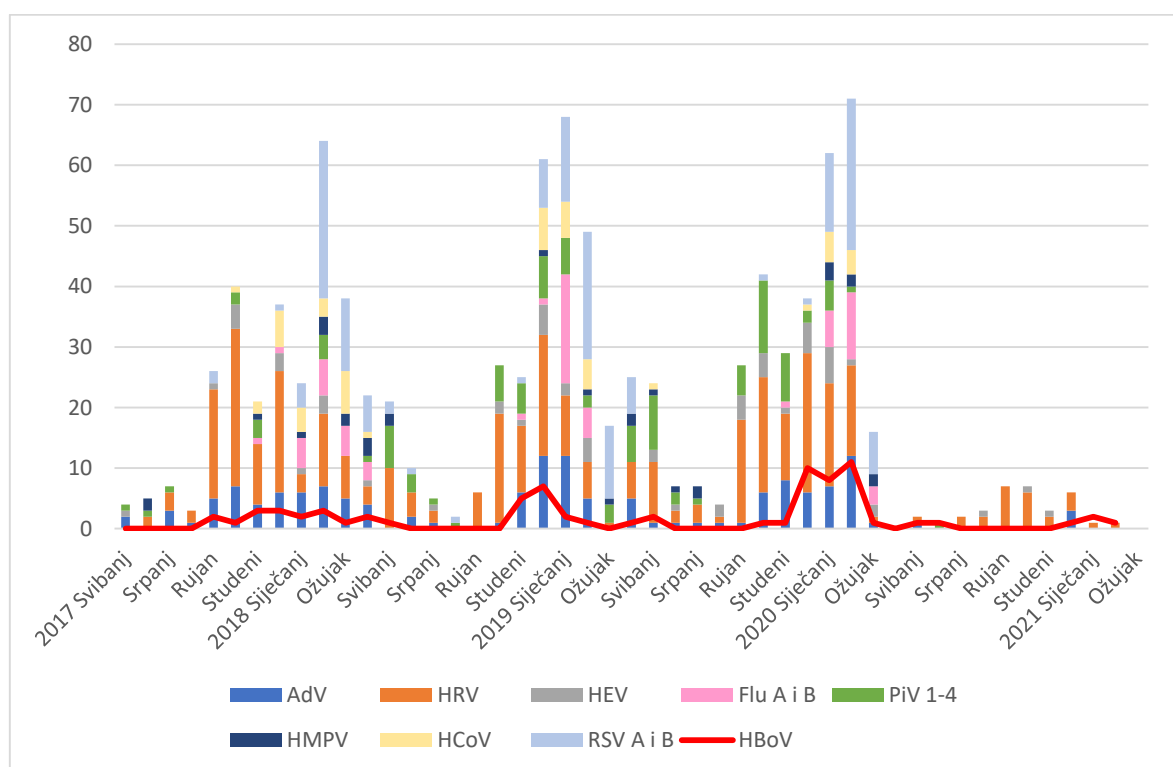
5.2.4.2. Sezonska pojavnost drugih respiratornih virusa u odnosu na HBoV

Najčešće detektirani respiratorni virus bio je humani rinovirus koji je bio detektiran kroz cijelo promatrano razdoblje u gotovo svim mjesecima, osim svibnja 2017., kolovoza 2018. te od travnja do lipnja 2020. godine. Najviše uzoraka s detektiranim rinovirusom bilo je u jesenskim mjesecima, rujnu i listopadu.

Adenovirus je najčešće detektiran u zimskim mjesecima, od prosinca do ožujka, ali je detektiran i u ljetnim mjesecima. Sličan uzorak pojavnosti uočen je i za viruse parainfluence i enteroviruse.

Vrhunac pojavnosti RSV-a bio je u veljači. Virusi influenza A i B javljali su se isključivo u razdoblju od studenoga do ožujka.

Detekcija sezonskih koronavirusa i HMPV-a bila je u zimskim mjesecima, dok ti virusi nisu detektirani u toplijem dijelu godine. Na slici 26 prikazana je sezonska distribucija virusa tijekom cijelog razdoblja istraživanja.



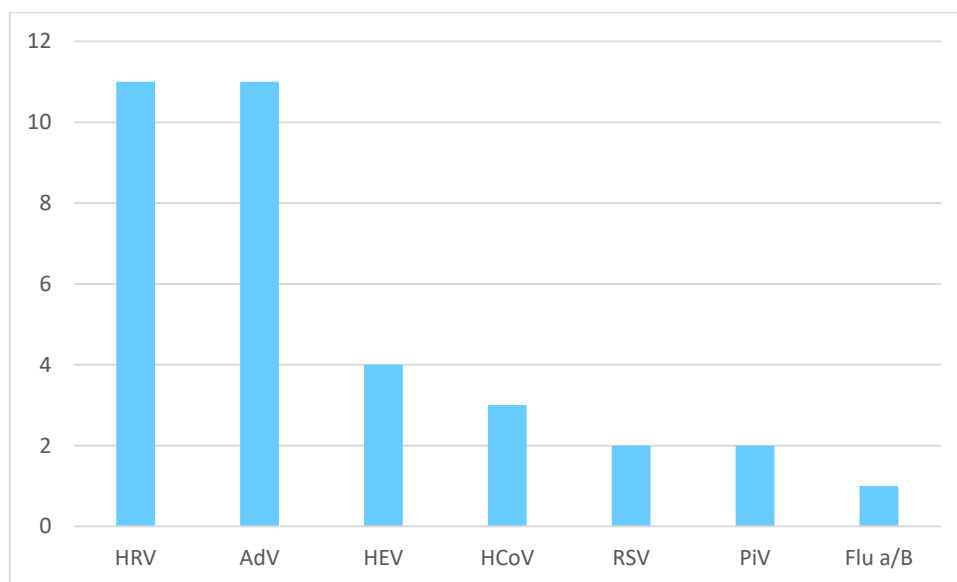
AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influenza A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 26. Sezonska pojavnost svih detektiranih respiratornih virusa

5.2.5. Kliničko-laboratorijske osobitosti djece kod koje je dokazan HBoV

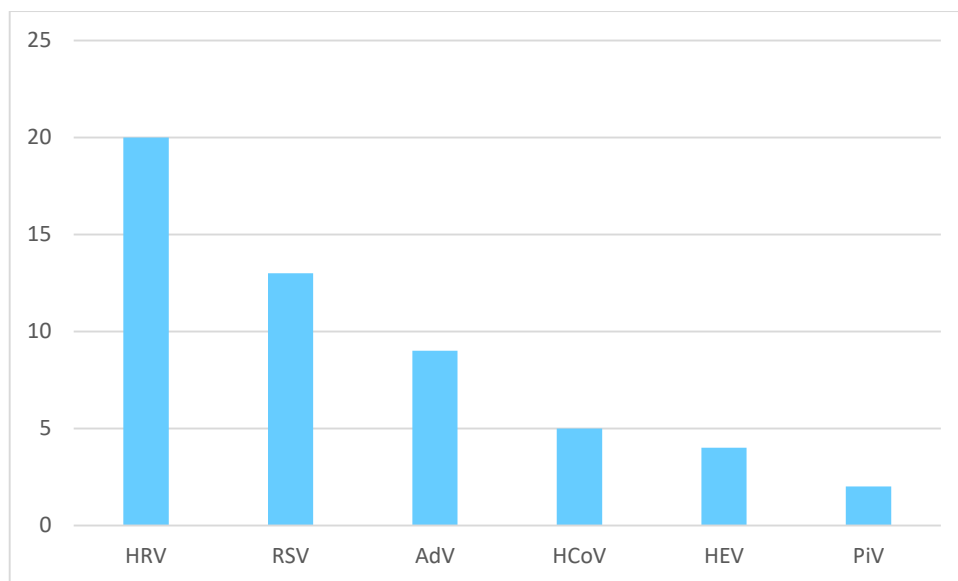
5.2.5.1. Učestalost infekcija gornjeg i donjeg dišnog sustava kod djece s detektiranim HBoV

Kliničku sliku infekcije gornjeg dišnog sustava (IGDS) imalo je 30 (30/73, 41,1 %) djece, od čega se u 12 (12/73, 16,4 %) djece infekcija klinički očitovala kao febrilni respiratorni katar, u devet (9/73, 12,3 %) kao upala srednjeg uha, u dvoje (2/73, 2,7 %) kao faringitis, u četvero (4/73, 5,5 %) kao tonzilitis, u jednog djeteta (1/73, 1,4 %) kao rinitis, a dvoje (2/73, 4,8 %) djece otpušteno je iz bolnice s glavnom otpusnom dijagnozom neoznačenog febrilnog stanja (*Status febrilis*). U šest (6/30, 20 %) slučajeva HBoV je bio jedini dokazani patogen, dok je u 24 slučaja (24/30, 80 %) HBoV bio detektiran s još jednim ili više respiratornih virusa, najčešće s HRV (slika 27).



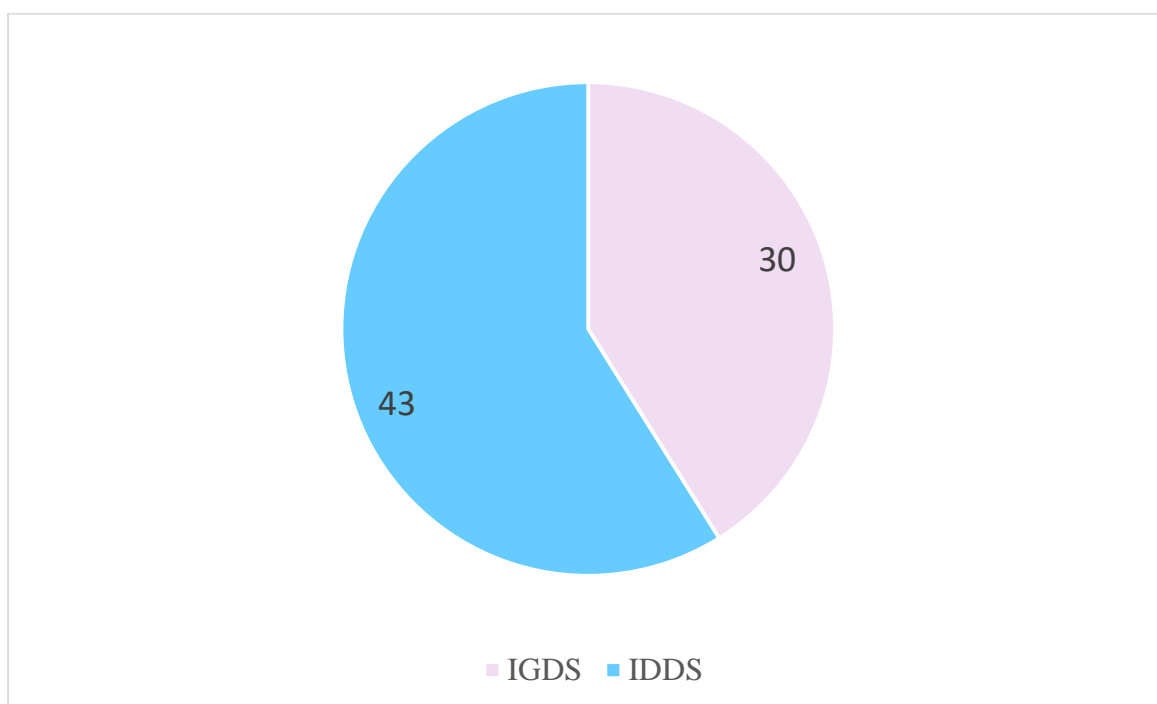
Slika 27. Prikaz najčešće kodetektiranih virusa u djece s infekcijom gornjeg dišnog sustava pozitivne na humani bokavirus

Infekciju donjeg dišnog sustava (IDDS) imalo je 43 (43/73, 58,9 %) djece, od čega se u 26 (26/73, 35,6 %) slučajeva radilo o pneumoniji, u 17 (17/73, 23,3 %) slučajeva o akutnom bronhitisu, a u četvero (4/73, 5,5%) djece bila je riječ o bronhiolitisu. U sedam uzoraka HBoV je bio jedini dokazani patogen (7/43, 16,3 %), dok je u 36 slučajeva (36/43, 83,7 %) HBoV bio detektiran s još jednim ili više respiratornih virusa. Najčešće kodetektirani virusi u djece s IDDS pozitivnom na HBoV prikazani su na slici 28.



Slika 28. Prikaz najčešće kodetektiranih virusa u djece s infekcijom donjeg dišnog sustava pozitivne na HBoV

Na slici 29 je prikazana raspodjela djece pozitivne na HBoV prema lokalizaciji infekcije.



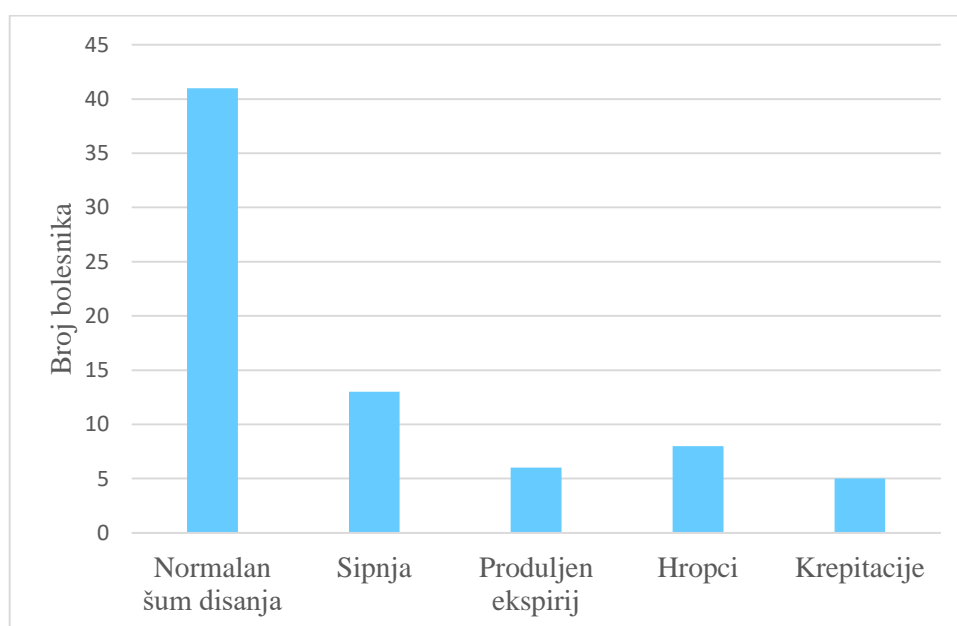
IGDS- infekcija gornjeg dišnog sustava, IDDS- infekcija donjeg dišnog sustava

Slika 29. Raspodjela djece pozitivne na HBoV prema lokalizaciji infekcije

5.2.5.2. Simptomi i fizikalni nalaz

Pri prijemu u bolnicu vrućicu je imalo 44 (44/73, 60.3 %) djece, od čega je 14 djece bilo subfebrilno, 28 febrilno, a dvoje djece visoko febrilno. Kašalj je bio izražen u 24 (24/73, 32.9 %) djece, a rinoreja u 28 (28/73, 38.4 %) djece. Gastrointestinalne tegobe (proljevi i povraćanje) zabilježene su u troje (3/73, 4.1 %) djece.

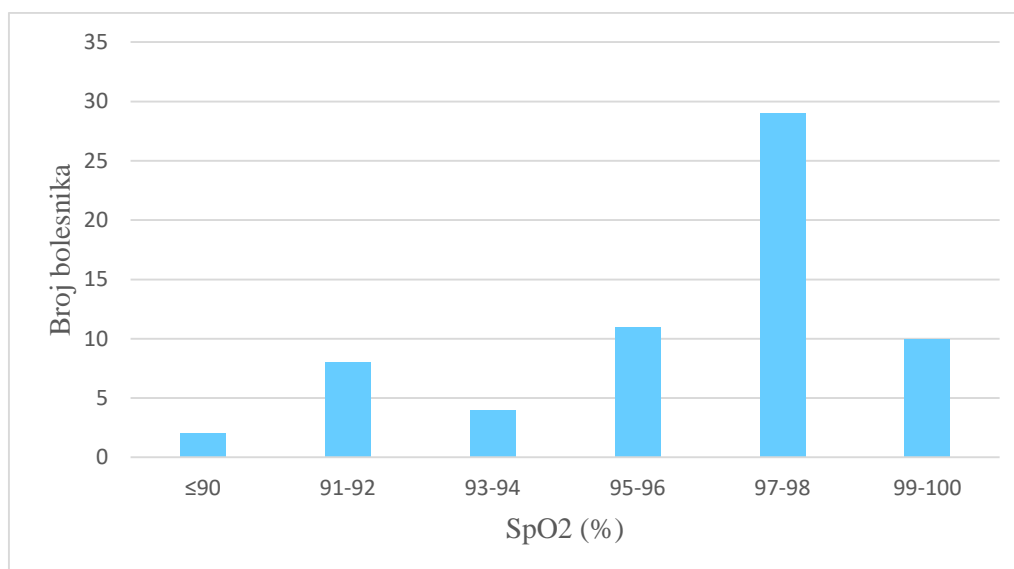
Iako je kao razlog dolaska u bolnicu u 37 (37/73, 50,1 %) djece bio naveden subjektivni osjećaj otežanog disanja (po navodu djeteta i/ili roditelja), na fizikalnom pregledu pri prijemu 48 (48/73, 65,8 %) djece bilo je eupnoično, 9 (9/73, 12,3 %) dispnoično, a 13 (13/73, 17,8 %) djece bilo je tahidispnoično uz korištenje pomoćne dišne muskulature. Kod 23 (23/73, 31,5 %) djece zabilježeno je hiperemično ili kataralično ždrijelo, a devet (9/73, 12,3 %) djece imalo je patološki otoskopski nalaz (hiperemija bubnjića, skraćen odsjaj ili zamućen bubnjić). Prilikom auskultacije pluća normalan šum disanja zabilježen je kod 41 (41/73, 56,2 %) djeteta, a abnormalan auskultacijski nalaz u 32 (32/73, 43,8 %) djece. U 13 (13/73, 17,8 %) djece uočena je sipnja, hropci su bili čujni u osmero (8/73, 11 %) djece, produljen ekspirij u njih šest (6/73, 8,2 %), a krepitacije su zabilježene u pet (5/73, 6,8 %) djece (slika 30). Kožne promjene imalo je 10 djece (10/73, 13,7 %), od čega njih pet urtikariju, dvoje djece imalo je eritem, a po jedno dijete purpuru, petehije i generalizirani osip po koži.



Slika 30. Auskultatorni nalaz kod djece pozitivne na HBoV (n=73)

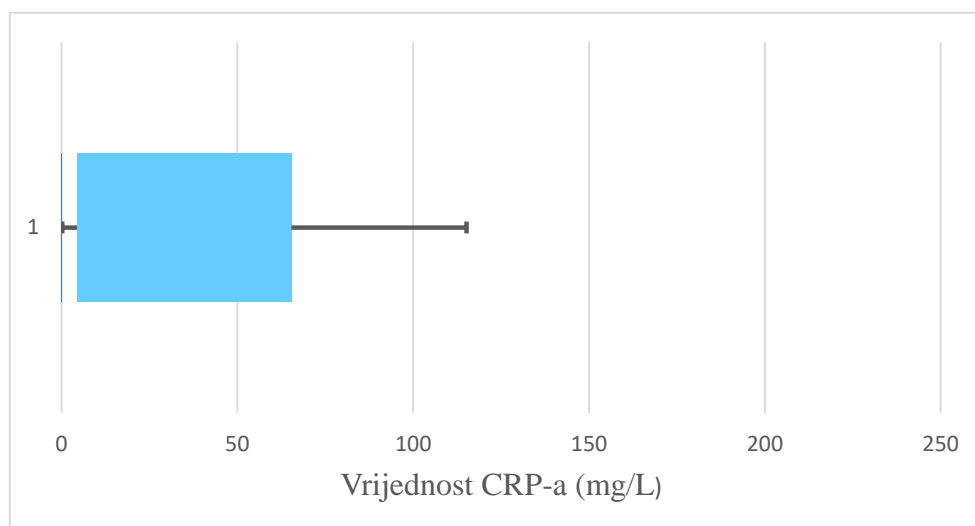
5.2.5.3. Laboratorijsko-radiološka obrada

Saturacija periferne arterijske krvi kisikom kod djece s dokazanim HBoV mjerena je kod 64 (64/73, 87,8 %) djeteta, a vrijednosti su prikazane na slici 31. Najniža saturacija ($SpO_2=75\%$) zabilježena je kod jednog djeteta koje je bilo zaprimljeno u jedinicu intenzivnog liječenja.

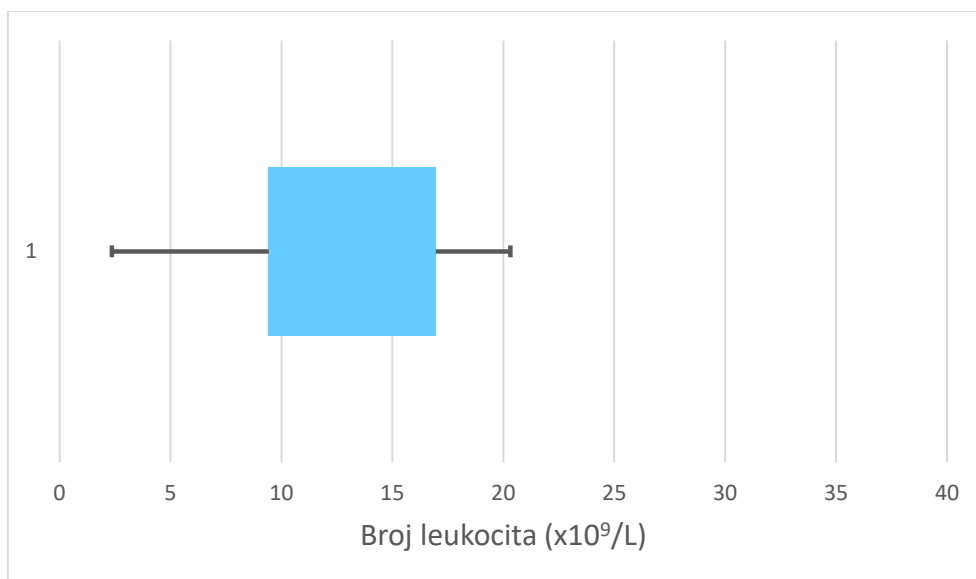


Slika 31. Izmjerene vrijednosti saturacije krvi kisikom (SpO_2) u djece s pozitivnim nalazom na HBoV (n=64)

Medijan vrijednosti CRP-a u djece s HBoV iznosilo je 15,5 mg/L, dok je medijan vrijednosti broja leukocita iznosio $13,6 \times 10^9/L$ (slike 32 i 33).

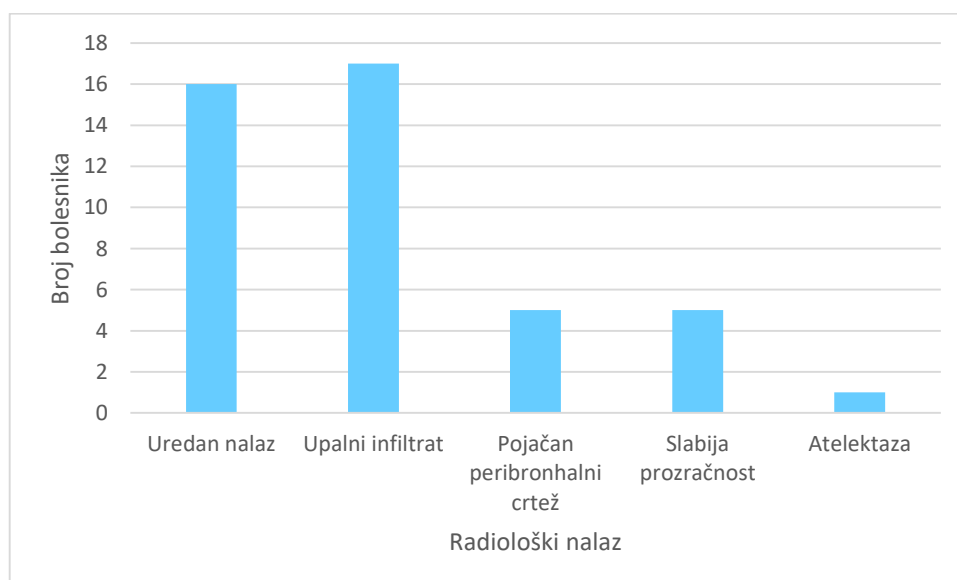


Slika 32. Vrijednosti CRP-a u djece s pozitivnim nalazom na HBoV (n=73)



Slika 33. Vrijednosti leukocita u djece s pozitivnim nalazom na HBoV (n=73)

Radiološka obrada (RTG srca i pluća i/ili UZV pluća) bila je indicirana za 44 (44/73, 60,3 %) djece s pozitivnim nalazom HBoV, od čega je 16 djece imalo uredan nalaz, a 28 (28/73, 38,4 %) djece patološki radiološki nalaz, od čega je 24 djece imalo patološki RTG, a četvero djece patološki nalaz UZV pluća. Promjene koje odgovaraju upalnom infiltratu bile su vidljive kod 17 djece, pojačan peribronhalni crtež u pet slučajeva, slabija prozračnost u pet slučajeva, a jedno dijete imalo je atelektatične promjene na plućima (slika 34).



Slika 34. Radiološki nalaz kod djece s pozitivnim HBoV (n=44)

Rutinska mikrobiološka obrada tijekom hospitalizacije provedena je u 45 (45/73, 61,6 %) djece. Prikaz učinjenih pretraga dan je u tablici 12. Jedno dijete imalo je konkomitantnu

pneumokoknu bakterijemiju (potvrđen *Streptococcus pneumoniae* u hemokulturi,) a u jednog djeteta u hemokulturi je detektiran koagulaza-negativni stafilokok (KNS). Kod jednog djeteta iz brisa ždrijela izoliran je *Streptococcus pyogenes* (BHS-A), dok su u dvoje djece u brisu nazofarinksa izolirani *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Iz uzorka urina jednog djeteta izolirana je *Escherichia coli* u značajnom broju (više od 10^5 CFU/ml).

Tablica 12. Provedena rutinska mikrobiološka obrada kod djece pozitivne na HBoV (n=45)

Pretraga	Broj djece	Pozitivan nalaz	Izolirani uzročnik
Bris ždrijela bakteriološki	21	1	<i>S. pyogenes</i>
Bris nazofarinksa bakteriološki	13	2	<i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i>
Iskašljaj bakteriološki	1	0	
Aspirat traheje	1	0	
Hemokultura	20	2	<i>S. pneumoniae</i> , KNS
Urinokultura	17	1	<i>E. coli</i> $>10^5$ CFU/ml
Stolica -bakteriološki	6	0	
Stolica -virološki	6	0	

KNS, koagulaza negativni stafilokok; CFU, od od engl. *colony forming unit*

5.2.5.4. Tijek bolesti i ishodi liječenja

Sva djeca s pozitivnim nalazom na HBoV liječena su simptomatski uz provođenje antipireze, toalete nosa, parenteralne rehidracije i respiratorne fizikalne terapije po potrebi.

Tijekom hospitalizacije bronhodilatator (ipratropij bromid i salbutamol) je primalo 28 (28/73, 38 %) djece, inhalacijsku terapiju kortikosteroidima sedam (7/73, 10 %), dok je sistemskom primjenom kortikosteroida (metilprednizolon) liječeno 12 (12/73, 16,4 %) djece. Petero djece primalo je antihistaminik, a troje montelukast. Jedno dijete liječeno je racemičnim epinefrinom, a kod jednog djeteta u terapiji je korišten i aminofilin. Nadomjesno liječenje kisikom tijekom hospitalizacije zahtijevalo je 10 (10/73, 13,7 %) djece pozitivne na HBoV.

Antimikrobnu terapiju primalo je 36 (36/73, 49,3 %) djece, a najčešće korišteni antibiotik bio je ceftriakson kojeg je primalo 30 (30/73, 41,1 %) djece. Po učestalosti primjene slijedi kombinacija amoksicilina s klavulanskom kiselinom koja je ordinirana kod šest (6/73, 8,2 %)

djece. Po troje djece primalo je azitromicin, odnosno klindamicin. Jedno dijete liječeno je penicilinom V.

U jednog djeteta bilo je potrebno primijeniti mjere intenzivnog liječenja tijekom četiri dana. U rutinskoj mikrobiološkoj obradi kod tog djeteta detektiran je virus influence A antigenim testom iz brisa nazofarinksa. Međutim, multipleks PCR-om detektiran je samo HBoV, dok virus gripe nije bio dokazan. Kvantitativnim PCR-om utvrđena je koncentracija virusa od $4,42 \times 10^6$ kopija/ml.

Ni jedno dijete s dokazanim HBoV nije zahtijevalo mehaničku ventilaciju tijekom hospitalizacije.

Jedno dijete kod kojega je inicijalno multipleks PCR-om detektiran HBoV premješteno je u drugu ustanovu na daljnje liječenje. Radilo se o djevojčici u dobi od 14 mjeseci koja je primljena zbog febrilnog respiratornog katara i petehijalnog osipa prisutnog četiri dana pred prijem. Drugi dan boravka dijete je razvilo konvulzivni napadaj s kratkim gubitkom svijesti i trzajevima ekstremiteta u trajanju ne duljem od 3 minute. S obzirom na nalaz lumbalne punkcije koji je govorio u prilog infekcije središnjeg živčanog sustava, dijete je upućeno u Kliniku za infektivne bolesti na daljnje liječenje. Međutim, kod ovog djeteta HBoV nije dokazan drugim dvjema metodama. Naime, inicijalnim testiranjem metodom multipleks PCR-a, uz HBoV detektiran je enterovirus i adenovirus, uz vrlo slabi pozitivni nalaz HBoV-a. MT-PCR analizom dokazano je da dominira enterovirus (intenzitet 5 *), uz adenovirus i parechovirus intenziteta 2*, dok HBoV nije detektiran ovom metodom. Rezultat kvantitativnog PCR-a na HBoV također je bio negativan.

5.2.6. Prikaz bolesnika s monodetekcijom humanim bokavirusom (n=13)

U sekretu nazofarinksa 13 (13/73, 17,8 %) djece detektiran je samo HBoV. Radilo se o sedam dječaka i pet djevojčica, a medijan dobi djece s monodetekcijom HBoV bio je 1,63 godine.

U šestero (6/13, 46,1 %) djece radio se o infekciji gornjeg dišnog sustava (IGDS), a otpusne dijagnoze bile su akutni rinitis, febrilni respiratorni katar (n=3) i febrilno stanje (*status febrilis*) (n=2). U dva djeteta s IGDS bile su prisutne i kožne manifestacije (urtikarija i alergijska

purpura). U petero djece s infekcijom gornjeg dišnog sustava (IGDS) dokazane su niske koncentracije HBoV u uzorku (manje od 10^4 kopija/ml).

U sedmero (7/13, 53,9 %) djece s monodetekcijom HBoV radilo se o infekciji donjeg dišnog sustava (IDDS). U uzorcima šestero njih dokazana je visoka koncentracija virusa (viša od 10^4 kopija/ml), a u pet uzoraka koncentracija je bila viša i od 10^6 kopija/ml. Otpusne dijagnoze bile su pneumonija (u pet slučajeva) i bronhitis (u dva slučaja). Četvero (4/13, 30,8 %) djece imalo je komorbiditete u anamnezi: radilo se o jednom djetetu koje je rođeno prijevremeno u 29. tjednu trudnoće, dvoje djece s malformacijama probavnog i krvožilnog sustava te o jednom djetetu koje je u anamnezi imalo zabilježene učestale bronhitise.

Radiološka obrada učinjena je za svih sedmero djece s IDDS i monodetekcijom HBoV, a petero djece imalo je prisutne radiološke promjene na RTG-u. Antimikrobnu terapiju primalo je četvero djece, a nadomjesno liječenje kisikom bilo je potrebno u dvoje djece. Intenzivno liječenje zahtijevalo je jedno dijete, prethodno opisano. Koncentracija virusa u uzorku tog djeteta iznosila je $4,42 \times 10^6$ kopija/ml.

5.3. Rezultati kvantitativnog PCR-a na HBoV

5.3.1. Koncentracije HBoV virusa u svim uzorcima pozitivnima na HBoV

Kvantitativni PCR na humani bokavirus učinjen je za 73 uzorka koja su bila pozitivna na HBoV, a bio je uspješan u 66 (66/73, 90,4 %) uzoraka. Količina virusa u uzorcima (engl. *viral load*) kretala se od 9,71 do $2,14 \times 10^7$ kopija/ml (medijan $3,91 \times 10^4$ kopija/ml). U 39 (39/73, 53,4 %) uzoraka nađena je visoka koncentracija (više od 10^4 kopija/ml), a u 34 (34/73, 46,6 %) uzoraka koncentracija virusnih čestica bila je manja od 10^4 kopija/ml (tablica 13). Svi uzorci (13/13) u kojima je HBoV bio detektiran kao jedini virus (monodetekcija) uspješno su kvantificirani. Medijan koncentracije za te uzorke iznosio je $2,85 \times 10^5$ kopija/ml.

Sedam (7/73, 9,6 %) uzoraka koji su bili pozitivni na HBoV multipleks PCR testu bilo je negativno na kvantitativnom PCR testu. U svih sedam slučajeva HBoV detektiran je u kombinaciji s drugim virusom na multipleks PCR (kodetekcija).

Tablica 13. Rezultati kvantitativnog PCR testa za uzorke u kojima je detektiran HBoV

Br. uzorka	Rezultat multipleks PCR	Kodetekcija	CT	Rezultat qPCR HBoV (kopija/ml)	Lokalizacija infekcije
1	HBoV	ne	13,06	$2,14 \times 10^7$	IDDS

2	HBoV, HEV	da	13,07	1,71 X 10 ⁷	IGDS
3	HBoV	ne	10,27	1,36 X 10 ⁷	IGDS
4	HBoV, HCoV, HRV	da	10,45	1,24 X 10 ⁷	IGDS
5	HBoV, HRV	da	10,84	1,01 X 10 ⁷	IGDS
6	HBoV, Adv, HRV	da	10,87	1,00 X 10 ⁷	IGDS
7	HBoV, RSV B	da	14,64	9,70 X 10 ⁶	IGDS
8	HBoV	ne	11,3	8,00 X 10 ⁶	IDDS
9	HBoV, HRV	da	14,56	7,76 X 10 ⁶	IDDS
10	HBoV, Adv	da	15,72	4,81 X 10 ⁶	IDDS
11	HBoV, HRV	da	15,51	4,71 X 10 ⁶	IDDS
12	HBoV	ne	16,05	4,42 X 10 ⁶	IDDS
13	HBoV, HRV	da	15,81	3,90 X 10 ⁶	IDDS
14	HBoV, HRV	da	16,19	3,30 X 10 ⁶	IDDS
15	HBoV	ne	17,29	2,30 X 10 ⁶	IDDS
16	HBoV, Adv	da	17,3	2,29 X 10 ⁶	IGDS
17	HBoV, Adv	da	17,42	1,72 X 10 ⁶	IGDS
18	HBoV, HRV	da	17,87	1,56 X 10 ⁶	IDDS
19	HBoV, HCoV	da	17,88	1,55 X 10 ⁶	IDDS
20	HBoV, HRV	da	14,7	1,37 X 10 ⁶	IGDS
21	HBoV, HRV	da	18,23	1,28 X 10 ⁶	IDDS
22	HBoV	ne	18,5	1,22 X 10 ⁶	IDDS
23	HBoV, PIV 4, Adv	da	19,04	8,40 X 10 ⁵	IDDS
24	HBoV, HCoV, HRV	da	15,85	7,57 X 10 ⁵	IGDS
25	HBoV, Adv	da	20,66	3,12 X 10 ⁵	IGDS
26	HBoV, HEV	da	20,98	3,01 X 10 ⁵	IDDS
27	HBoV	ne	17,73	2,85 X 10 ⁵	IDDS
28	HBoV, Adv	da	21,36	2,17 X 10 ⁵	IGDS
29	HBoV, HRV	da	21,63	1,88 X 10 ⁵	IDDS
30	HBoV, RSV A	da	20,46	1,56 X 10 ⁵	IDDS
31	HBoV, PIV 3	da	23,25	8,00 X 10 ⁴	IGDS
32	HBoV, Adv	da	21,56	7,24 X 10 ⁴	IDDS
33	HBoV, HRV	da	23,86	6,63 X 10 ⁴	IDDS
34	HBoV, HRV	da	25,03	3,91 X 10 ⁴	IGDS
35	HBoV, Adv, HRV, HCoV OC43, HEV	da	21,6	3,83 X 10 ⁴	IGDS
36	HBoV, RSV B	da	24,65	3,82 X 10 ⁴	IDDS
37	HBoV, HRV	da	25,39	3,23 X 10 ⁴	IGDS
38	HBoV	ne	26,45	1,48 X 10 ⁴	IDDS
39	HBoV, HEV	da	23,58	1,38 X 10 ⁴	IGDS
40	HBoV, Adv, RSV B	da	24,59	8,16 X 10 ³	IGDS
41	HBoV, HRV	da	28,36	6,77 X 10 ³	IGDS
42	HBoV, HRV	da	35,9	6,29 X 10 ³	IGDS
43	HBoV	ne	28,59	4,78 X 10 ³	IGDS
44	HBoV, Adv, HRV, HEV,	da	28,64	4,67 X 10 ³	IDDS
45	HBoV, RSV A	da	28,95	4,53 X 10 ³	IDDS
46	HBoV	ne	28,7	4,51 X 10 ³	IGDS
47	HBoV, HRV, HEV	da	29,67	2,70 X 10 ³	IDDS

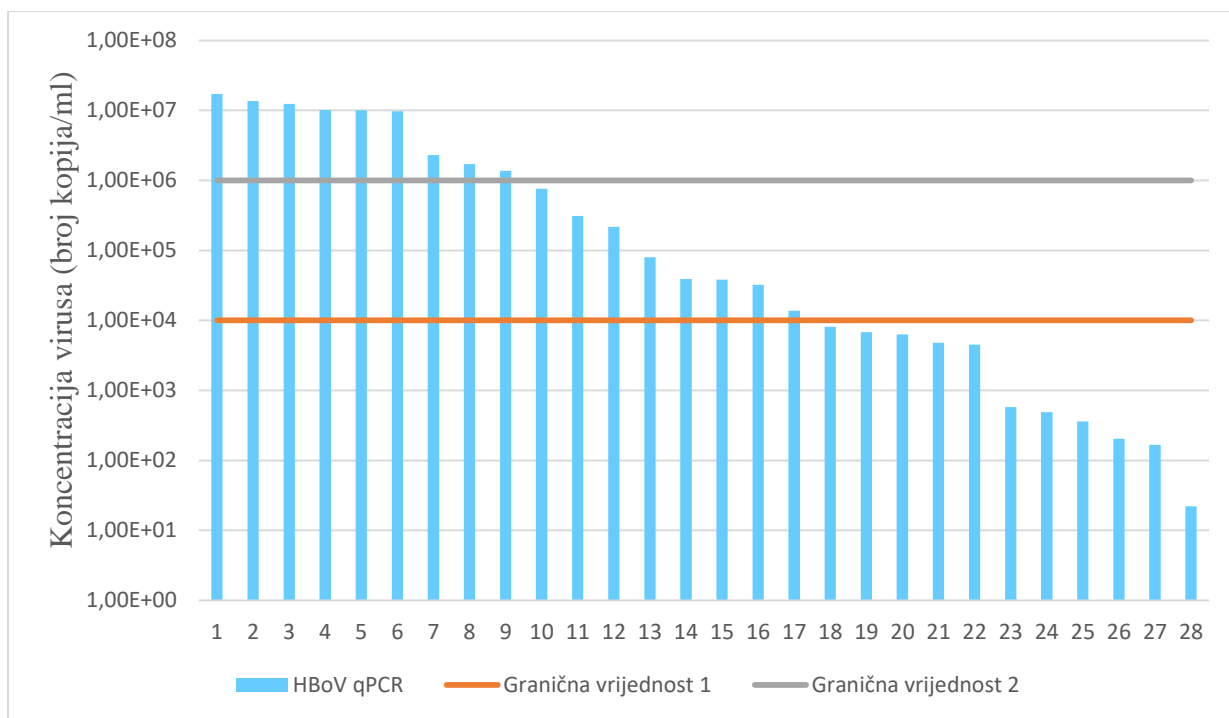
48	HBoV, HCoV OC 43, RSV A	da	27,75	1,59 X 10 ³	IDDS
49	HBoV, AdV, RSV A	da	27,77	1,57 X 10 ³	IDDS
50	HBoV, AdV, HRV, RSV B	da	28,37	1,15 X 10 ³	IDDS
51	HBoV, HRV	da	28,51	5,86 X 10 ²	IDDS
52	HBoV, RSV A	da	32,8	5,81 X 10 ²	IDDS
53	HBoV, AdV	da	32,8	5,81 X 10 ²	IGDS
54	HBoV AdV, Flu A	da	33,29	4,89 X 10 ²	IGDS
55	HBoV	ne	30,6	3,61 X 10 ²	IGDS
56	HBoV, HRV	da	33,89	3,55 X 10 ²	IDDS
57	HBoV, PIV 4	da	34,76	2,03 X 10 ²	IGDS
58	HBoV, RSV A, HCoV, HRV	da	34,92	1,86 X 10 ²	IDDS
59	HBoV	ne	35,29	1,67 X 10 ²	IGDS
60	HBoV, RSV A	da	30,92	1,11 X 10 ²	IDDS
61	HBoV, HMPV	da	31,7	6,45 X 10	IDDS
62	HBoV, AdV, HRV, RSV A	da	31,8	5,99 X 10	IDDS
63	HBoV, RSV A, HRV	da	38,06	3,71 X 10	IDDS
64	HBoV	ne	39	2,22 X 10	IGDS
65	HBoV, RSV B	da	33,74	1,57 X 10	IDDS
66	HBoV, HRV, HEV, HCoV	da	34,43	9,71	IDDS
67	HBoV, HRV	da	0	0	IDDS
68	HBoV, AdV, HRV	da	0	0	IGDS
69	HBoV, RSV A, HCoV	da	0	0	IDDS
70	HBoV, PIV 4, AdV, HRV, PIV1	da	0	0	IDDS
71	HBoV, AdV	da	0	0	IDDS
72	HBoV, HRV	da	0	0	IDDS
73	HBoV, HEV, AdV	da	0	0	IGDS

CT, od engl. *cycle threshold*; qPCR, kvantitativni PCR; IGDS, infekcija gornjeg dišnog sustava; IDDS, infekcija donjeg dišnog sustava; AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

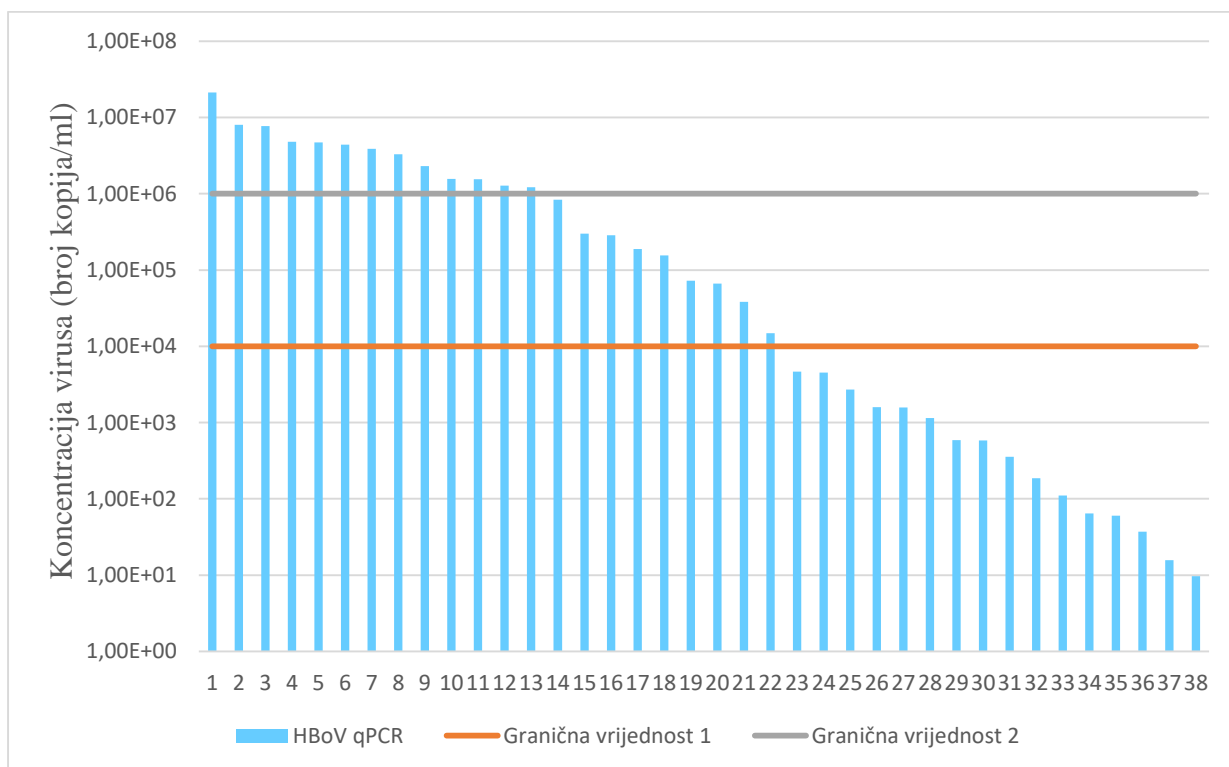
5.3.2. Analiza kliničko-laboratorijskih značajki kod djece s visokom i niskom koncentracijom HBoV u nazofaringealnom sekretu

5.3.2.1. Usporedba koncentracija HBoV u djece s infekcijom gornjeg i donjeg dišnog sustava bez obzira na kodetekciju

Medijan koncentracije HBoV za sve bolesnike s infekcijom gornjeg dišnog sustava (IGDS) iznosio je $8,16 \times 10^3$ kopija/ml (donja granica IQR $2,82 \times 10^2$, gornja granica IQR $1,06 \times 10^6$) (slika 35). Medijan koncentracije HBoV u slučajevima infekcije donjeg dišnog sustava (IDDS) iznosio je $5,23 \times 10^4$ kopija/ml (donja granica IQR $5,82 \times 10^2$, gornja granica IQR $1,56 \times 10^6$) (slika 36).



Slika 35. Koncentracije HBoV u nazofaringealnom sekretu djece s infekcijom gornjeg dišnog sustava (n=28)



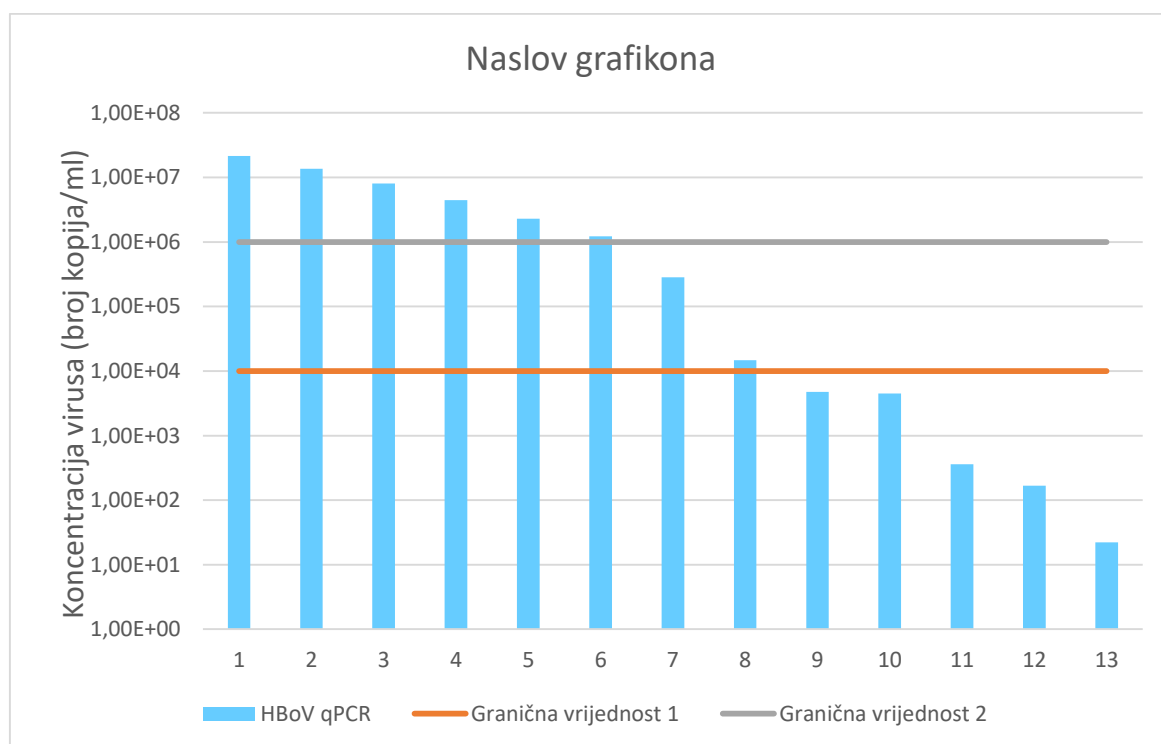
Slika 36. Koncentracije HBoV u nazofaringealnom sekretu djece s infekcijom donjeg dišnog sustava (n=38)

S obzirom da izmjerene vrijednosti koncentracije HBoV u uzorcima ne pokazuju normalnu distribuciju, korišten je Mann Whitney test kako bi se ispitala veza između lokalizacije infekcije i vrijednosti koncentracije. Dobivena vrijednost p iznosi 0,322 te ne potvrđuje statistički značajnu razliku koncentracije HBoV između bolesnika s IGDS i onih s IDDS.

Međutim, budući se radi o uzorcima u kojima je uz HBoV u velikoj većini detektiran i neki drugi virus, što može značajno utjecati na rezultat, isto je dalje testirano i za slučajeve monoinfekcije.

5.3.2.2. Usporedba koncentracija HBoV u slučajevima monodetekcije virusa

U 13 uzoraka detektiran je samo HBoV (monodetekcija) te su koncentracije virusa u tim uzorcima prikazane na slici 37.



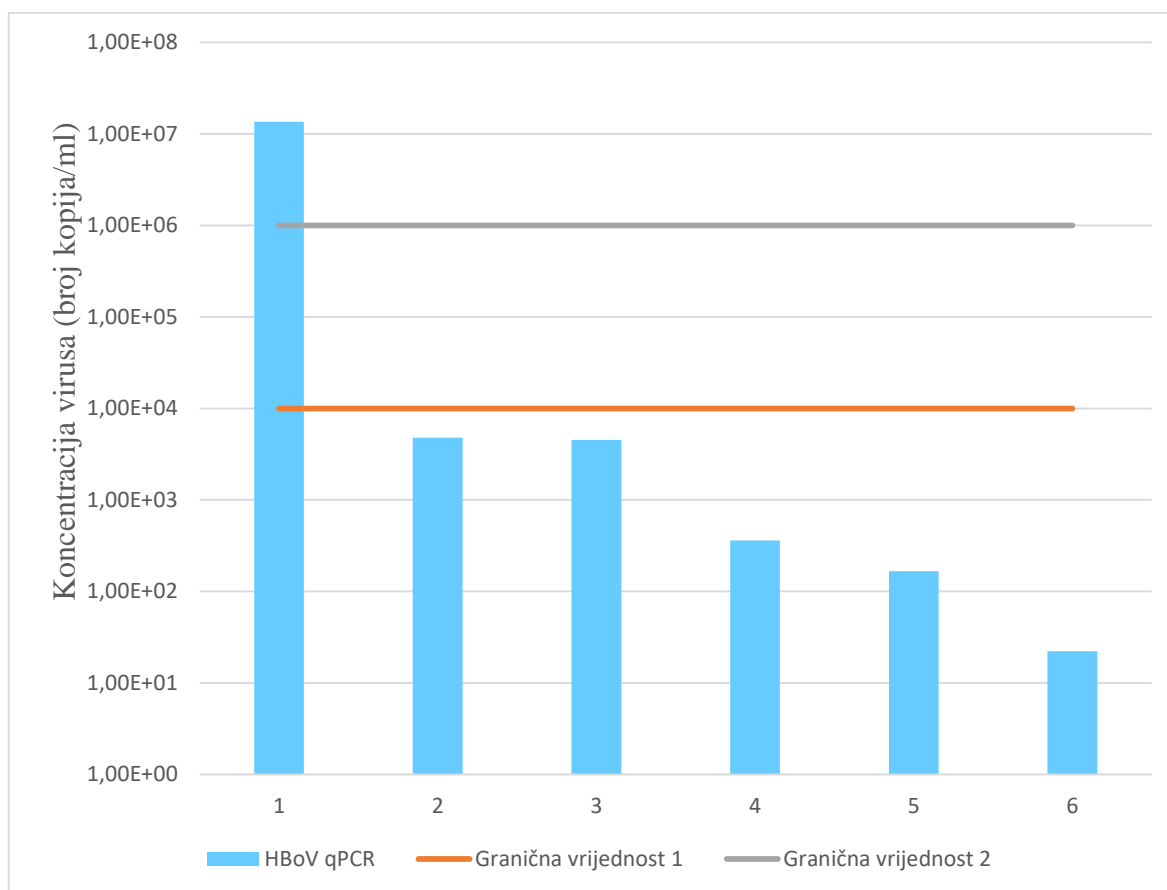
Slika 37. Koncentracije virusa u uzorcima u kojima je detektiran samo HBoV (monodetekcija)

U slučajevima gdje je HBoV bio jedini dokazani patogen, a bio je zahvaćen gornji dišni sustav, medijan koncentracije HBoV iznosio je $2,46 \times 10^3$ kopija/ml (donja granica IQR $3,75 \times 10^2$,

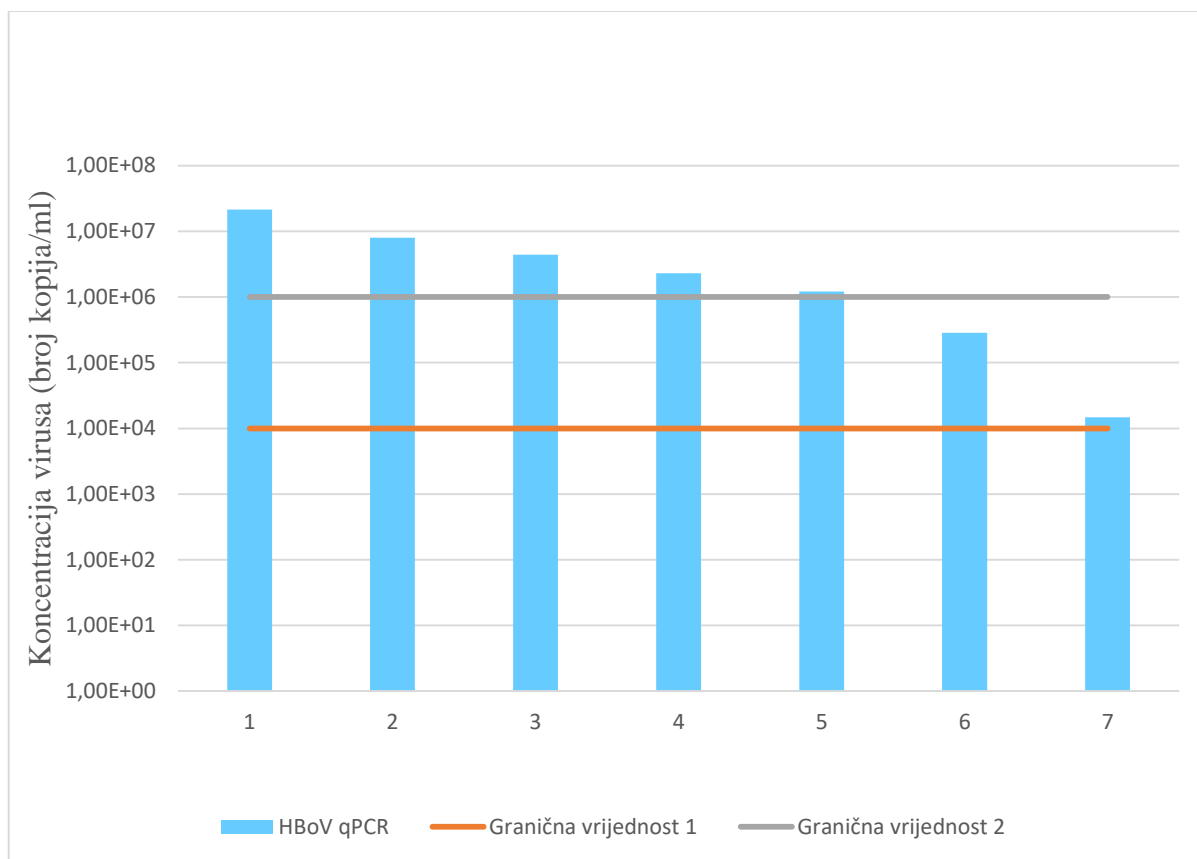
gornja granica IQR $4,71 \times 10^3$). Kod djece s infekcijom donjeg dišnog sustava medijan koncentracije HBoV iznosio je $2,3 \times 10^6$ kopija/ml (donja granica IQR $7,53 \times 10^5$, gornja granica IQR $6,21 \times 10^6$).

Dobivena p-vrijednost testa iznosi $p=0,016$, što je statistički značajna razlika. Odnosno, među monoinfekcijama HBoV, kod bolesnika s infekcijom donjeg dišnog sustava razina koncentracije virusa bila je veća u odnosu na bolesnike s infekcijom gornjeg dišnog sustava.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički: na slici 38 prikazane su koncentracije HBoV u slučaju monoinfekcije ovim virusom i kliničke slike infekcije gornjeg dišnog sustava, a na slici 39 prikazane su koncentracije HBoV u bolesnika koji su razvili infekciju donjeg dišnog sustava. Na oba grafa su označene granice visoke koncentracije virusa, granična vrijednost 1 iznosi 10^4 kopija/ml (vrijednost korištena našoj u analizi), a granična vrijednost 2 iznosi 10^6 kopija/ml.



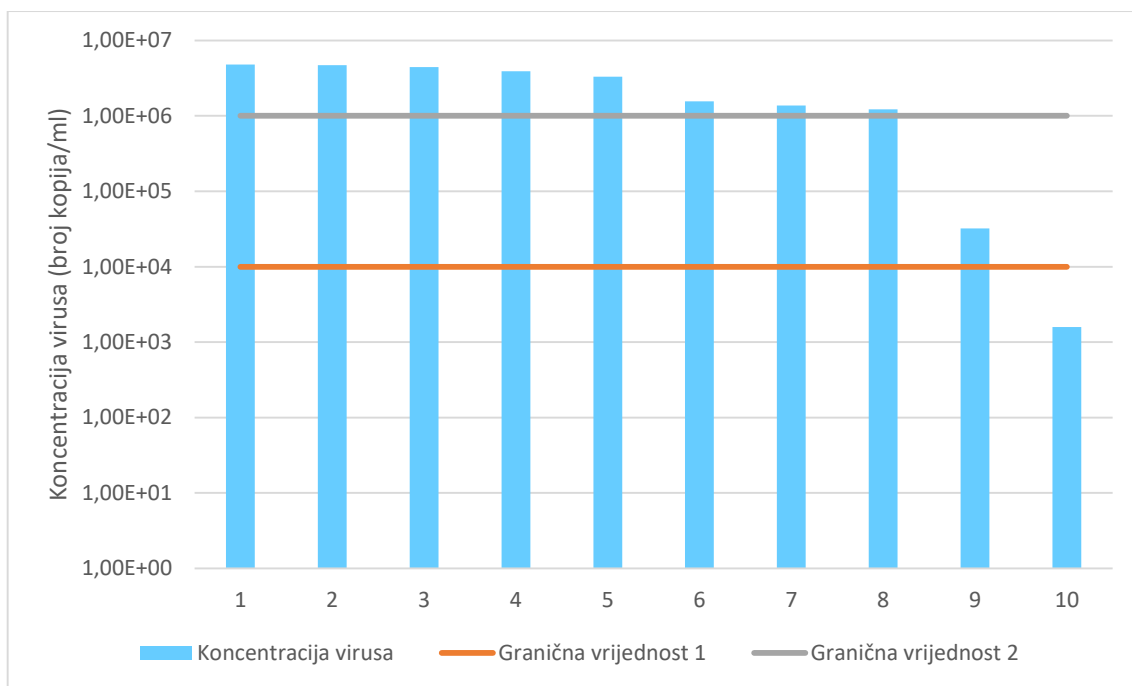
Slika 38. Koncentracija HBoV u slučajevima djece s monodetekcijom HBoV i kliničkom slikom infekcije gornjeg dišnog sustava (n=6)



Slika 39. Koncentracija HBoV u slučajevima djece s monodetekcijom i infekcijom donjeg dišnog sustava (n=7)

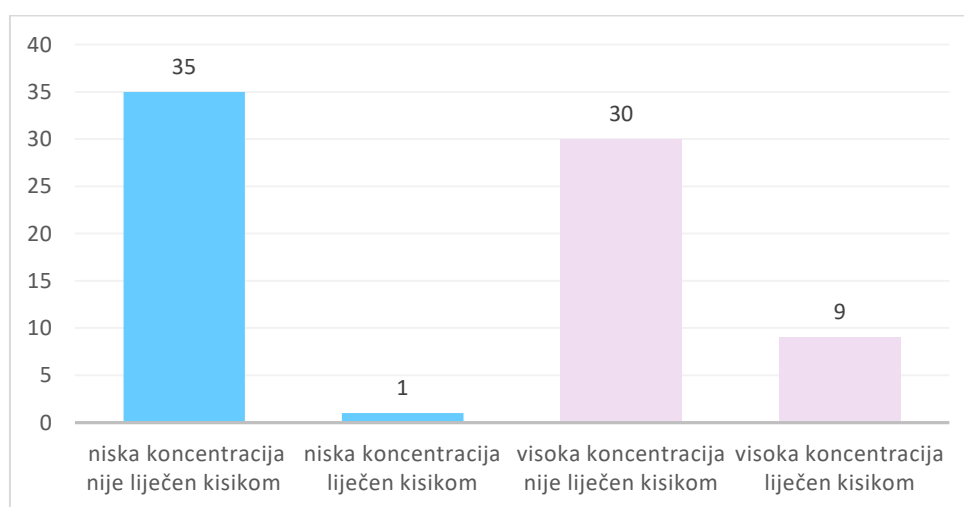
5.3.2.3. Koncentracije virusa u djece koja su razvila respiratornu insuficijenciju te imala potrebu za nadomjesnim liječenjem kisikom

Od 73 djece s dokazanim humanim bokavirusom, 10 (10/73, 13,7 %) djece razvilo je respiratornu insuficijenciju zbog čega je bilo provedeno nadomjesno liječenje kisikom. Kvantitativni PCR pokazao je da je u 9/10 njih HBoV bio prisutan u visokoj koncentraciji (višoj od 10⁴ kopija/ml), od čega je u osam uzoraka koncentracija iznosila više od 10⁶ kopija /ml (slika 40).



Slika 40. Koncentracija HBoV u djece koja su liječena nadoknadom kisika

Na slici 41 prikazan je odnos broja djece koja su liječena nadoknadom kisika kod koje je bila prisutna niska koncentracija i one kod koje je dokazana visoka koncentracija virusa. Iz grafa je vidljivo da 97 % djece s niskom koncentracijom virusa nije zahtijevalo terapiju kisikom (n=35), a 3 % je trebalo kisik (n=1), dok je u slučajevima djece kod koje je HBoV bio u visokoj koncentraciji 23 % njih trebalo nadoknadu kisika (n=9), a 67 % je bilo zadovoljavajuće oksigenacije (n=30).



Slika 41. Udio djece koja su liječena nadoknadom kisika u skupini djece s niskom i visokom razinom HBoV (n=73)

Vežu između potrebe za kisikom i razine koncentracije ispitana je Mann-Whitney testom.

Dobivena p-vrijednost testa iznosi $p=0,022$ te zaključujemo kako postoji razlika u koncentraciji kod bolesnika koji su razvili respiratornu insuficijenciju te imali potrebu za nadomjesnim liječenjem kisikom u odnosu na one kod kojih je respiratorna funkcija bila očuvana, odnosno kod bolesnika koji su liječeni nadoknadom kisika, razina koncentracije je veća, u odnosu na bolesnike koji nisu liječeni nadoknadom kisika.

U dva uzorka bolesnika koji su primali kisik HBoV dokazan je u monodetekciji, dok je u ostalih 8 uzoraka HBoV bio prisutan u kodetekciji s drugim virusom. MT-PCR-om je analizirana količina drugih dokazanih virusa u tim uzorcima. Rezultati su pokazali da je u šest uzoraka HBoV bio prisutan u visokom intenzitetu, od čega je u tri uzorka detektiran i drugi virus u visokom intenzitetu (4* i 5*). Kod HBoV pozitivnog djeteta koje je liječeno nadoknadom kisika, a HBoV je bio u niskoj koncentraciji, MT-PCR-om je utvrđeno da dominira RSV u uzorku, čiji je intenzitet bio 5* (tablica 14).

Tablica 14. Rezultati analize uzoraka kod HBoV pozitivne djece koja su liječena nadoknadom kisika

	Multipleks PCR	qPCR (kopija/ml)	MT-PCR Intenzitet HBoV (*)	MT-PCR Intenzitet drugog virusa (*)
1	HBoV, AdV	$4,81 \times 10^6$	5*	RV/EV 5*, EV 4*, AdV 1*
2	HBoV, HRV	$4,71 \times 10^6$	5*	RV/EV 4*, parecho 1*
3	HBoV	$4,42 \times 10^6$	/	/
4	HBoV, HRV	$3,90 \times 10^6$	5*	RV/EV 5*
5	HBoV, HRV	$3,30 \times 10^6$		n.v.
6	HBoV, HCoV	$1,55 \times 10^6$	5*	HCoV 2*, RV/EV 1*
7	HBoV, HRV	$1,37 \times 10^6$	5*	RV/EV 3*, parecho 1*
8	HBoV	$1,22 \times 10^6$	/	/
9	HBoV, HRV	$3,23 \times 10^4$	4*	RV/EV 3*
10	HBoV, RSV A, HCoV	$1,59 \times 10^3$	1*	RSV 5*, HCoV 2*

HBoV, humani bokavirus; AdV, adenovirus; HRV, humani rinovirus; HCoV, sezonski koronavirusi; RSV A, respiratorni sincicijski virus A; RV/EV, rinovirus/enterovirus; EV, enterovirus; / uzorci u kojima je HBoV bio jedini dokazani patogen te MT-PCR nije rađen; n.v. MT-PCR nije rađen zbog nedovoljnog volumena uzorka

5.3.3. Tijek i ishodi liječenja u djece s visokom i niskom koncentracijom HBoV

5.3.3.1. Duljina hospitalizacije

Prosječna duljina hospitalizacije sve ispitivane djece iznosila je 7,5 dana, a dok su djeca s dokazanim HBoV bila hospitalizirana u prosjeku 5,46 dana. Djeca koja su imala HBoV u monodetekciji bila su hospitalizirana 5,54 dana, a djeca kod koje je uz HBoV dokazan i drugi respiratorni virus 5,37 dana. Djeca koja su imala visoku koncentraciju HBoV u uzorku bila su hospitalizirana 5,85 dana dok su djeca s niskom koncentracijom bila hospitalizirana prosječno 4,74 dana.

Provedena je statistička analiza kako bi se utvrdilo postoji li razlika u duljini hospitalizacije kod djece koja su imala visoku i nisku koncentraciju HBoV. Odnos između razine koncentracije HBoV i trajanja hospitalizacije ispitan je Mann-Whitney U testom, te je dodatno izračunat i Spearmanov koeficijent kao mjera jakosti (monotone) veze između ove dvije varijable, gdje Spearman = 1 upućuje na savršenu pozitivno monotonu vezu.

Za sve uzorke kod kojih je dokazan HBoV, bez obzira je li bio prisutan u monodetekciji ili s drugim virusom (n=73), p-vrijednost testa $p=0,04$ bila je manja od 5 % te postoji statistički značajna razlika u duljini hospitalizacije. Odnosno, kod bolesnika s niskom razinom koncentracije HBoV broj dana hospitalizacije bio je manji u odnosu na bolesnike s visokom razinom koncentracije HBoV (odnosno, kod bolesnika s visokom razinom koncentracije HBoV broj dana hospitalizacije bio je veći u odnosu na bolesnike s niskom razinom koncentracije HBoV). Spearmanov koeficijent korelacije iznosi 0,31, što upućuje na (slabu) pozitivno monotonu vezu između varijabli.

Za uzorke u kojima je dokazan samo HBoV (monodetekcija) dobivena je vrijednost $p=0,06$, iako granična, nije dokazano postojanje razlika u duljini hospitalizacije u odnosu na koncentraciju HBoV. Nadalje, Spearmanov koeficijent korelacije iznosi 0,35, međutim, snaga testa je ograničena veličinom uzorka.

5.3.3.2. Antimikrobna terapija u djece s visokom i niskom koncentracijom HBoV

Vezu između antimikrobne terapije i razine koncentracije HBoV kod djece pozitivne na HBoV ispituje se Mann-Whitney testom. Dobivena p-vrijednost iznosi $p=0,049$, a slučaju djece s

monodetekcijom HBoV $p=0,015$ te zaključujemo kako postoji značajna statistička razlika u koncentraciji HBoV kod djece liječene antibiotikom u odnosu na onu koja nisu liječena antibiotikom, za djecu kod koje je dokazan HBoV sam i u kodetekciji s drugim virusom.

5.3.3.3. Koncentracija HBoV u djece s komorbiditetima

Dodatne komorbiditete imalo je 13 (13/73, 17,8 %) djece s dokazanim HBoV: u sedmero djece radilo se o malformacijama probavnog i kardiovaskularnog sustava ($n=7$), po jedno dijete je imalo cističnu fibrozu ($n=1$), kožnu mastocitozu ($n=1$) i Downov sindrom ($n=1$), a odnosno je rođeno kao prematurus s 29 tjedana ($n=1$). U dvoje djece su bile zabilježene recidivirajuće bronhopostrukcije ($n=2$).

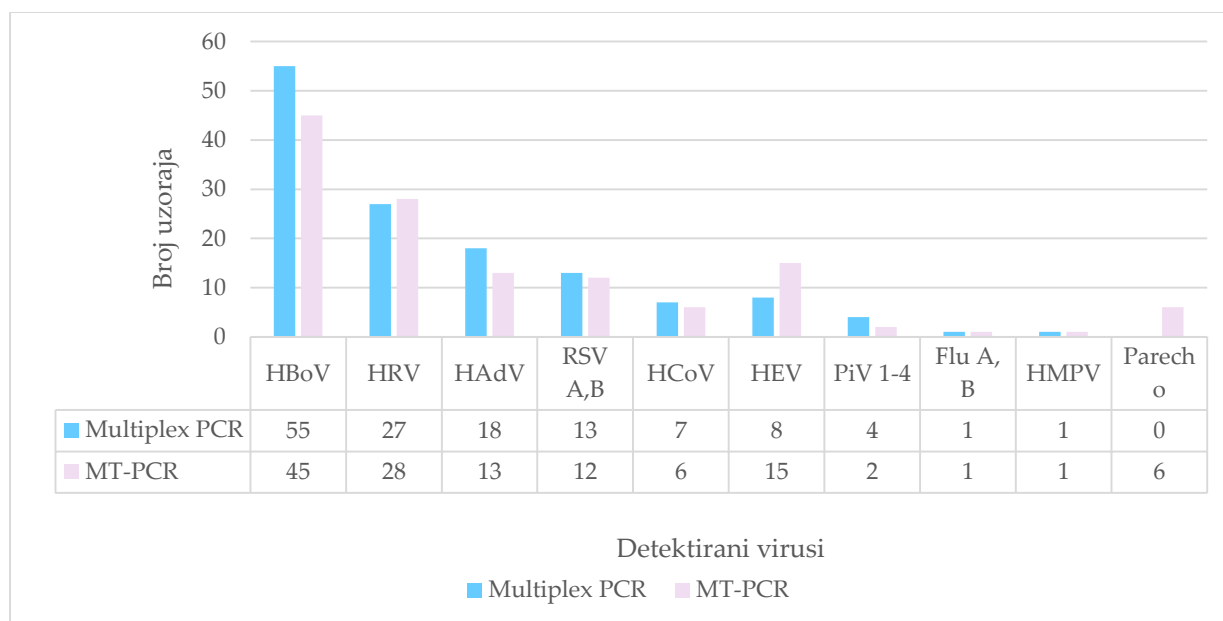
Među djecom s komorbiditetima 10 od 13 (76,9 %) njih imalo je visoku koncentraciju HBoV u uzorku, a medijan koncentracije HBoV u takve djece iznosio je $7,57 \times 10^5$ kopija/ml (donja granica IQR $7,24 \times 10^4$, a gornja granica IQR $1,37 \times 10^6$).

Statistička analiza veze između komorbiditeta i razine koncentracije ispitana je Mann-Whitney testom. Dobivena p-vrijednost testa manja je od 5 % ($p=0,017$) te kod pacijenata koji nemaju komorbiditete, razina koncentracije je manja, u odnosu na bolesnike koji imaju komorbiditete. Odnosno, bolesnici s predliježećim bolestima imaju statistički značajno više koncentracije HBoV od prethodno zdrave djece.

5.4. MT-PCR analiza uzoraka u kojima je detektirano više od jednog virusa

Od 60 uzoraka s kodetekcijom, 55 (55/60, 91,7 %) uzoraka bilo je podvrgnuto daljnjoj analizi MT-PCR metodom. HBoV je bio pozitivan u 45 (45/55) uzoraka na MT-PCR, dakle podudarnost rezultata je iznosila 81,8%. Najčešći virus detektiran i jednom i drugom metodom bio je humani rinovirus, a slijede humani adenovirus i RSV. Postotak podudarnosti rezultata najčešće detektiranih virusa u slučajevima kodetekcije s HBoV je bio 96,4 % za HRV, 72,2 % za HAdV, 92,3 % za RSV A/B, 85,7 % za HCoV te 53,3 % za HEV. Usporedba rezultata prikazana je na slici 42. Multipleks PCR ne sadrži početnice za parehovirus, dok MT-PCR sadrži početnice za humani rinovirus (RV/EV), koje su dizajnirane za otkrivanje humanih rinovirusa skupina A do C i humanih enterovirusa skupina A do D, te drugi set početnica koje

su specifične za humani enterovirus (EV), i to za enteroviruse grupe A do D. Ako su oba testa RV/EV i EV pozitivni, u uzorku je prisutan enterovirus. Ako je samo RV/EV test pozitivan, u uzorku je prisutan rinovirus.



AdV, adenovirus; Flu A i B, virusi influence A i B; HBoV, humani bokavirus; HCoV, sezonski koronavirusi; HEV, humani enterovirus; HMPV, humani metapneumovirus; HRV, humani rinovirus; PiV 1-4, virusi parainfluence 1-4; RSV A i B, respiratorni sincicijski virus A i B

Slika 42. Usporedba multipleks PCR-a i MT-PCR-a (n uzoraka=55).

U četiri uzorka MT-PCR-om otkriven je samo HBoV, dok drugi virusi nisu dokazani ovom metodom. Rezultati multipleks PCR i kvantitativnog HBoV PCR za te uzorke prikazani su u tablici 15.

Tablica 15. Uzorci u kojima je MT-PCR-om dokazan samo HBoV i rezultati druga dva testa za te uzorke

Multipleks PCR	HBoV kvantitativni PCR (broj kopija/ml)	MT- PCR	MT-PCR HBoV intenzitet*
HBoV, RSV B	$9,70 \times 10^6$	HBoV	5
HBoV, PiV 4, AdV	$8,40 \times 10^5$	HBoV	5
HBoV, PiV 4	$2,03 \times 10^2$	HBoV	1
HBoV, HRV	$5,86 \times 10^2$	HBoV	2

MT-PCR, multipleks tandem PCR; HBoV, humani bokavirus; AdV, adenovirus; HEV, humani enterovirus; PiV 4, virus parainfluence 4; HRV, humani rinovirus; RSV B, respiratorni sincicijski virus B;

*Intenzitet je iskazan u skali 1-5.

U 10 uzoraka koji su inicijalno bili HBoV pozitivni na multipleks PCR-u, HBoV nije dokazan i MT-PCR-om (jedan uzorak je bio negativan na sve testirane viruse). Analizom ovih uzoraka kvantitativnim PCR-om je dokazano da su ovi uzorci imali vrlo nisku koncentraciju HBoV ili bili negativni na kvantitativnom PCR-u, što je prikazano u tablici 16.

Tablica 16. Usporedba rezultata triju metoda za uzorke u kojima je HBoV bio negativan na MT-PCR-u ($n=10$).

Multipleks PCR	HBoV kvantitativni PCR (broj kopija/ml)	MT-PCR	MT-PCR kontrola kvalitete uzorka*
HBoV, HRV	$6,29 \times 10^3$	RV/EV**	3
HBoV, HRV, RSV A	37,1	RSV	4
HBoV, HRV, HEV, HCoV	9,71	HCoV, RV/EV, EV**	4
HBoV, HRV	0	RV/EV**	3
HBoV, HEV, AdV	0	RV/EV, EV**	5
HBoV, HRV	0	RV/EV**	3
HBoV, HRV, AdV, PiV 1, PiV 4	0	PiV 4	4
HBoV, RSV A, HCoV	0	RSV, RV/EV**	4
HBoV, HRV, AdV	0	AdV	4
HBoV, AdV	0	0	3

MT-PCR, multipleks tandem PCR; HBoV, humani bokavirus; AdV, adenovirus; HEV, humani enterovirus; PiV 4, virus parainfluenze 4; HRV, humani rinovirus; RSV B, respiratorni sincicijski virus B

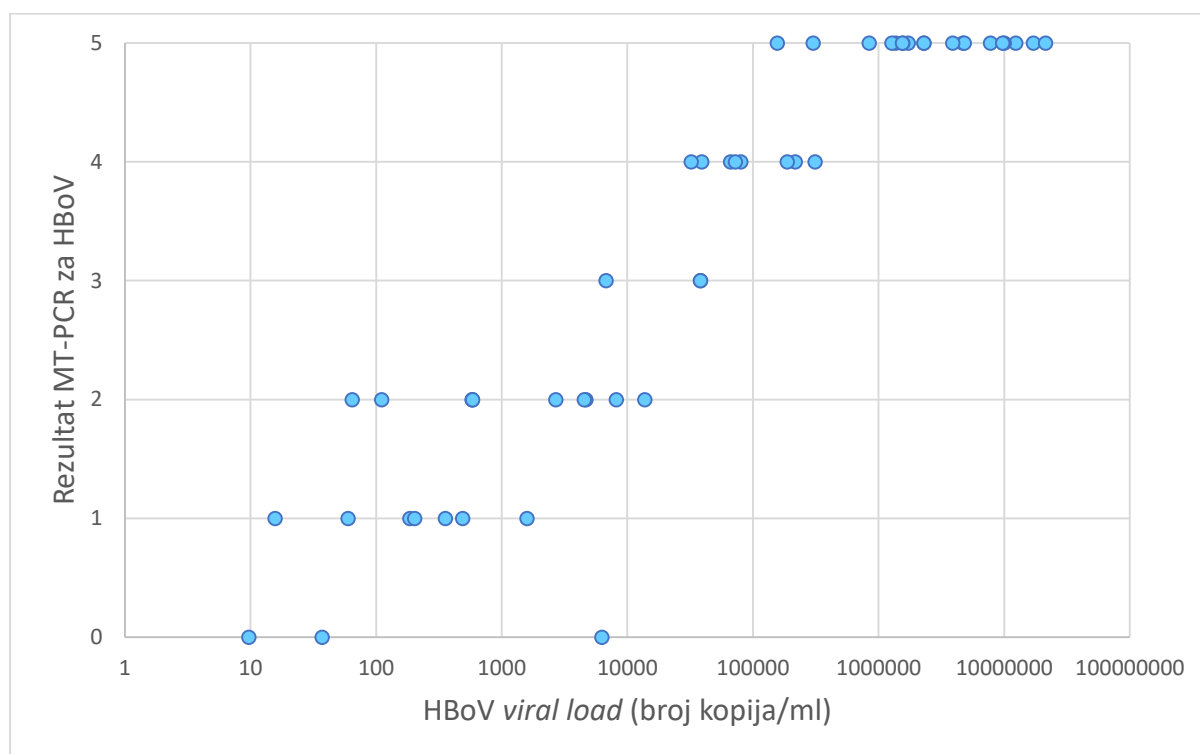
*MT-PCR kontrola kvalitete uzorka (od engl. *MT-PCR Sample Adequacy Control*)

** MT-PCR sadrži početnice za humani rinovirus (RV/EV), koje su dizajnirane za otkrivanje humanih rinovirusa skupina A do C i humanih enterovirusa skupina A do D, te drugi set početnica koje su specifične za humani enterovirus (EV), i to za enteroviruse grupe A do D. Ako su oba testa RV/EV i EV pozitivni, uzorak je enterovirus. Ako je samo RV/EV test pozitivan, uzorak je rinovirus.

5.4.1. Usporedba rezultata kvantitativnog PCR-a za HBoV i MT-PCR-a

Uspoređeni su rezultati HBoV kvantitativnog PCR-a s rezultatima MT-PCR-a. Iako MT-PCR ne izražava apsolutne kvantitativne koncentracije virusa u uzorku, može pružiti dodatne

informacije o tome koliko je ciljanog gena prisutno u uzorku pomoću prikaza s 5 zvjezdica označenog kao intenzitet. Usporedba rezultata prikazana je na slici 43.

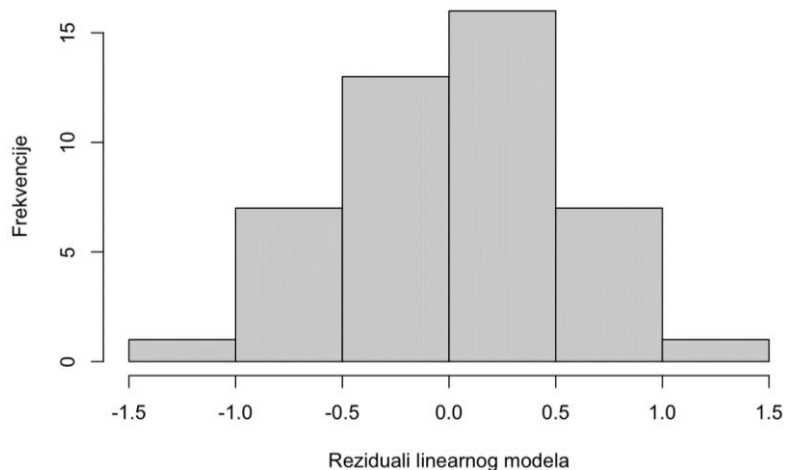


Slika 43. Usporedba rezultata MT-PCR-a i rezultata kvantitativnog PCR-a za HBov

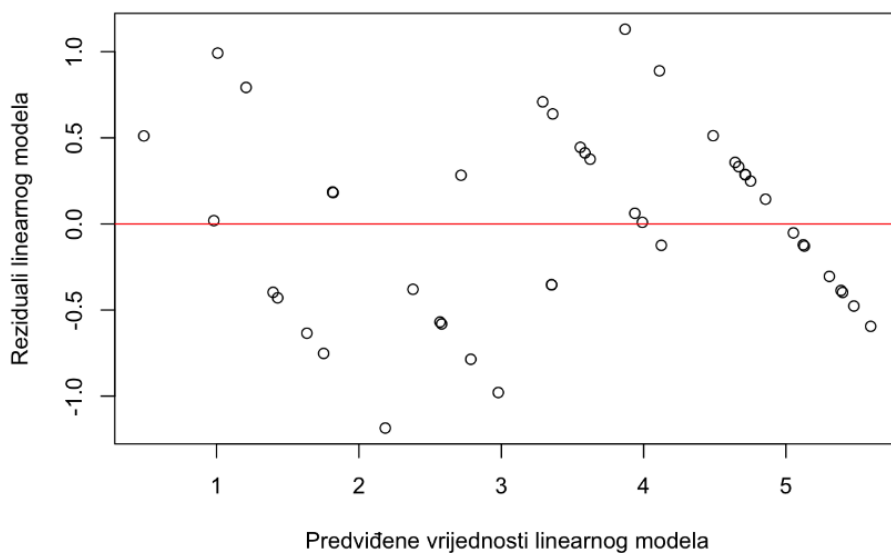
Uspoređeni su rezultati dvaju testova, kvantitativnog PCR-a za HBov, koji nam daje podatak o točnom broju kopija bokavirusa u ml uzorka, i MT-PCR-a, koji nam daje mjeru intenziteta signala umnoženog odsječka genoma bokavirusa, pri čemu dobiveni signal uspoređuje s umjetnom kontrolom (SPIKE). Ove dvije mjere su na različitim skalama (koncentracija se kreće od 0 do 10^7 , a intenzitet od 1 do 5). Zbog toga je koncentracija HBov-a logaritmirana i time dobivene dvije varijable (log koncentracija i intenzitet) na istim skalama. Podudarnost ovih metoda provjerena je ispitivanjem postoji li zavisnost između intenziteta dobivenog MT-PCR-om i logaritmiranih vrijednosti koncentracije HBov-a izgradnjom linearnog modela te računanjem Pearsonovog i Spearmanovog koeficijenta korelacije.

Regresijski koeficijent linearnog modela statistički je značajan (p-vrijednost je manja od 5 %) što upućuje na postojanje veze između koncentracije i intenziteta signala.

No, da bi mogli koristiti zaključke testa značajnosti regresijskog koeficijenta, trebamo provjeriti jesu li zadovoljene pretpostavke testa, odnosno jesu li reziduali modela normalni, homoskedastični i nezavisni (slike 44 i 45).



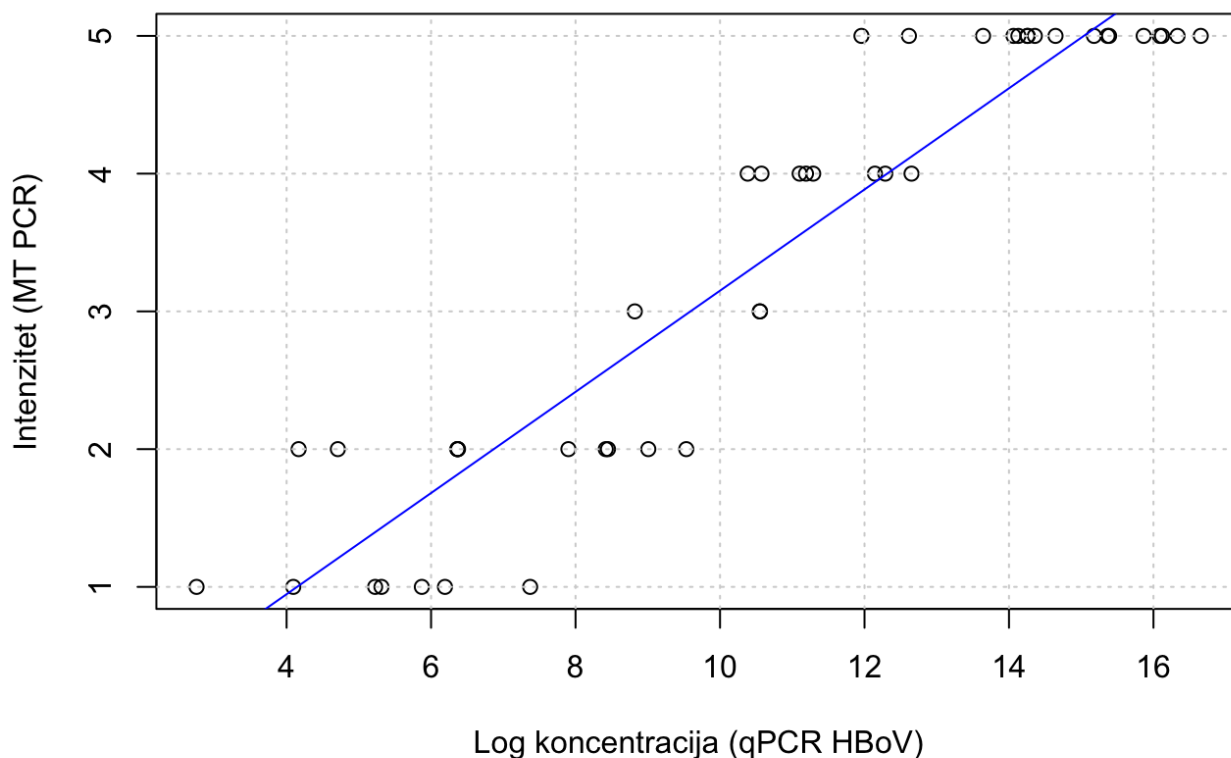
Slika 44. Provjera pretpostavki- normalnost reziduala



Slika 45. Provjera pretpostavki - normalnost i homoskedastičnost reziduala

Reziduali ne prikazuju veliko odstupanje od normalnosti i homoskedastičnosti, stoga možemo donositi statističke zaključke iz regresijskog modela.

Na slici 46 prikazan je odnos intenziteta dobivenog MT-PCR-om i logaritmirane koncentracije dobivene kvantitativnim PCR-om – dobiveni graf pokazuje postojanje veze između intenziteta i koncentracije HBoV-a.



Slika 46. Odnos logaritmirane vrijednosti koncentracije humanog bokavirusa dobivene kvantitativnim PCR-om i intenziteta signala dobivenog MT PCR-om (

Pearsonov koeficijent korelacije (mjera jakosti linearne veze) iznosi 0,939, što dodatno ide u prilog postojanju linearne veze između intenziteta i logaritmiranih vrijednosti koncentracije (odnosno monotono rastuće veze između intenziteta i koncentracije).

Dodatno je izračunat Spearmanov koeficijent korelacije za originalne podatke (nelogaritmirane) te on iznosi 0,937. Za razliku od Pearsonovog, Spearmanov koeficijent korelacije je neparametarski te ispituje postojanje monotone (ne nužno linearne) veze u podacima.

U skladu sa svime do sada, i Spearmanov koeficijent korelacije pokazuje postojanje monotono rastuće veze između intenziteta i koncentracije.

5.4.2. Usporedba kliničke slike u slučajevima koinfekcije

Također, istraženo je postoji li razlika u lokalizaciji infekcije u dišnim putevima (IGDS i IDDS) u vezi s količinom virusa u uzorku. U tu svrhu bolesnici su podijeljeni u četiri skupine:

- A- Bolesnici s uzorcima s visokom koncentracijom HBoV (više od 10^4 kopija/mL kvantitativnim PCR-om) i visokim koncentracija drugih virusa (intenzitet 4-5 zvjezdica na MT-PCR);
- B- Bolesnici s uzorcima s visokom koncentracijom HBoV (više od 10^4 kopija/mL kvantitativnim PCR-om) i niskom koncentracijom drugih virusa (intenzitet 1-3 zvjezdice na MT-PCR);
- C- Bolesnici s uzorcima s niskom koncentracijom HBoV (manje od 10^4 kopija/mL kvantitativnim PCR-om) ili negativno te visoka koncentracija drugih virusa (intenzitet 4-5 zvjezdica na MT-PCR);
- D- Bolesnici s uzorcima s niska koncentracija HBoV (manje od 10^4 kopija/mL kvantitativnim PCR-om) ili negativno te niska koncentracija drugih virusa (intenzitet 1-3 zvjezdice na MT-PCR).

Tablica 17. Usporedba lokalizacije infekcije u dišnim putevima

Skupina	qPCR HBoV koncentracija	MT-PCR intenzitet drugog virusa	IGDS (broj bolesnika)	IDDS (broj bolesnika)
A	Visoka	4-5*	6	8
B	Visoka	1-3*	8	6
C	Niska	4-5*	5	9
D	Niska	1-3*	4	9
Ukupno			23	32

IGDS-infekcija gornjih dišnih puteva, IDDS-infekcija donjih dišnih puteva

Rezultati su prikazani u tablici 17. Nije bilo statistički značajne razlike između skupina prema Pearsonovom hi-kvadrat testu ($p = 0,53$).

5.5. Rezultati genotipizacije HBoV

Od 73 uzorka koja su bila pozitivna na HBoV, 49 (67,1 %) uzoraka bilo je dostupno za dodatnu analizu. Među njima je 29 sekvenci uspješno utvrđeno. U početku smo pokušali umnožiti skoro cijele genome u jednom PCR amplikonu, postigavši uspjeh u samo pet uzoraka (HR1119-19, HR1097-19, HR1223-20, HR142-17 i HR387-18). Posljedično, većina uzoraka umnožena je u tri preklapajuća fragmenta. U konačnici, od 49 uzoraka podvrgnutih PCR amplifikaciji, u njih 24 rezultat su bili amplikoni koji su obuhvatili gotovo cijeli genom HBoV-a, dok se za pet uzoraka uspjelo generirati amplikone koji pokrivaju dvije trećine genoma. Kao što je bilo predviđeno, svi su uzorci usklađeni s HBoV 1 referentnom sekvencom (pristupni br.

KP710213). Sve u svemu, uzorci su pokazali visoku pokrivenost, s prosjekom od 13 048 x. Četiri uzorka (HR1223-20, HR142-17, HR387-18, HR421-18) pokazala su značajno nižu pokrivenost i podvrgnuta su dodatnoj analizi kroz *de novo* sastavljanje i BLAST pretragu duljih kontinuiranih nizova sastavljenih od skupa fragmenata (engl. *contig*) koji prelaze 400 bp. U svim slučajevima, dulji nizovi pretežno su sadržavali ljudske sekvence (nije prikazano), što je onemogućilo daljnje poboljšanje reprodukcije. Unatoč nižoj pokrivenosti, uspješno je dobivena konsenzusna sekvenca koja pokriva cijelu amplificiranu regiju, s najnižom prosječnom pokrivenošću od 25x za HR142-17 (tablica 18).

Tablica 18. Sažetak rezultata sekvenconiranja

Oznaka uzorka	Broj čitanja	Čitanje nakon QC	% mapiranih čitanja	Prosječna pokrivenost	Duljina pokrivenog genoma**
HR1119-19	923,440	900,168	74,9	12,703	1 - 5212
HR73-17	1,049,712	893,292	72,8	12,325	1 - 5212
HR88-17	852,090	822,068	87,4	17,225	1 - 5212
HR165-17	791,812	764,284	89,3	16,206	1 - 5212
HR169-17	1,065,688	1,044,282	66,4	14,164	1 - 5212
HR199-17	1,023,004	997,492	86,1	16,351	1 - 5212
HR249-18	821,676	772,300	88,2	14,987	1 - 5212
HR392-18	1,112,498	1,106,784	82,9	34,300*	1 - 3303
HR538-18	938,192	929,582	63,6	12,392	1 - 5212
HR543-18	880,722	850,502	85,6	25,429*	1515 - 5212
HR547-18	1,554,628	1,533,056	84,8	25,318	1 - 5212
HR623-18	199,334	198,980	86,2	4,472	1 - 5212
HR658-19	1,087,006	1,067,550	88,8	23,111	1 - 5212
HR963-19	951,628	949,956	81,3	17,782	1 - 5212
HR1046-19	1,016,564	1,012,774	76,1	28,834*	1 - 3303
HR1097-19	696,036	637,982	79,6	12,885	1 - 5212
HR1223-20	693,162	624,032	0,7	118	1 - 5212
HR1289-20	805,228	797,680	89,0	17,869	1 - 5212
HR1304-20	785,420	764,868	83,1	15,483	1 - 5212
HR1307-20	367,584	366,012	80,7	6,187	1 - 5212
HR1340-20	436,744	436,012	75,8	7,853	1 - 5212
HR1350-20	991,316	988,222	83,2	17,847	1 - 5212
HR142-17	716,450	713,238	0,2	25	1 - 5212
HR182-17	837,682	815,558	86,6	17,498	1 - 5212
HR287-18	757,522	735,720	89,7	16,613	1 - 5212
HR387-18	704,188	678,748	1,3	168	1 - 5212
HR421-18	484,234	481,492	0,5	78*	1 - 3303
HR578-18	986,276	978,436	61,6	21,202*	1 - 3303
HR697-19	771,762	744,216	77,5	13,567	1 - 5212

* Pokrivenost je označena prema djelomičnoj pokrivenosti genoma.

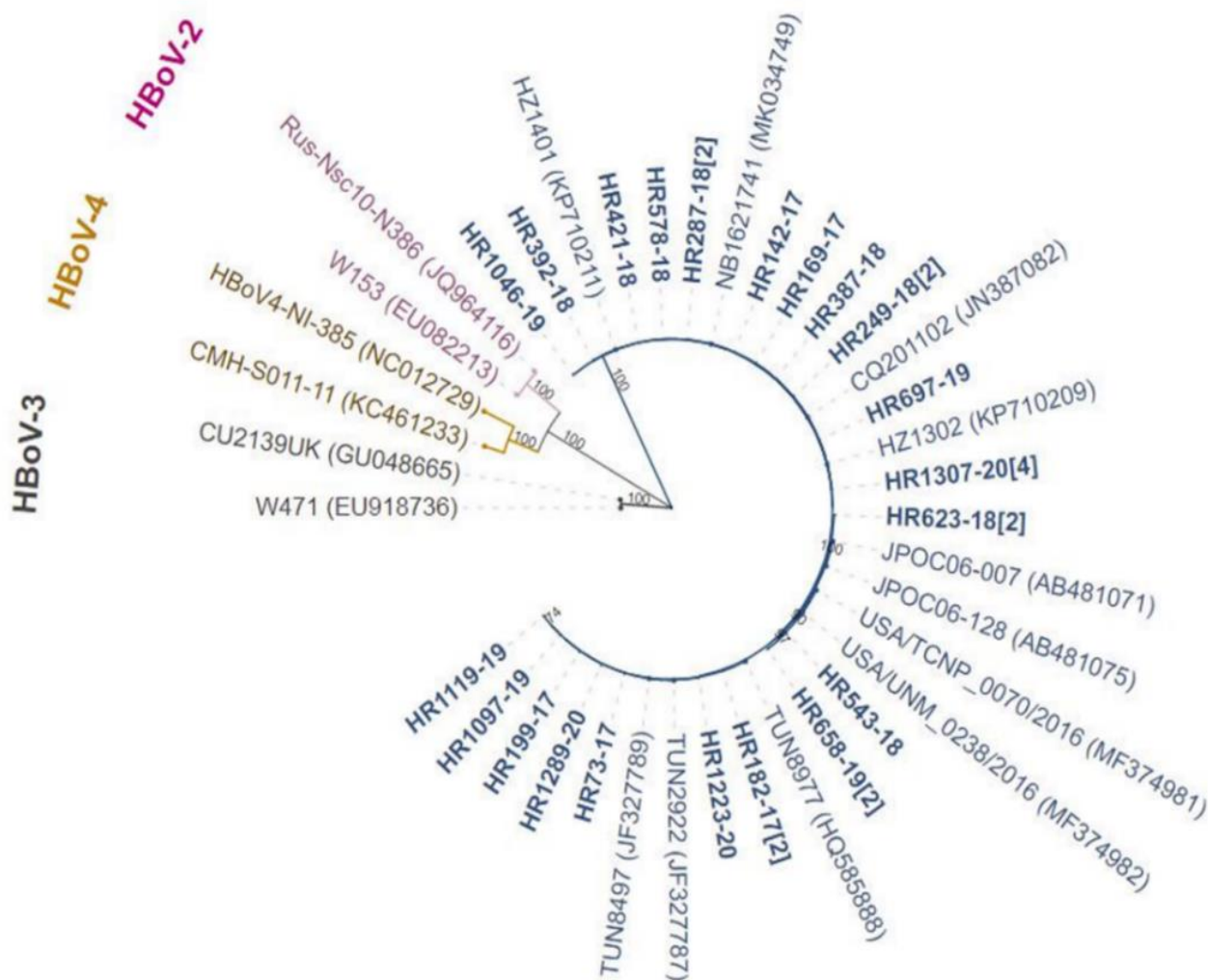
**Položaj prema GenBank sekvenci KP710213.

5.5.1. Filogenetska analiza sojeva

Na temelju 5212 bp sekvenci dobivenih iz naših uzoraka i srodnih sekvenci preuzetih iz baze podataka izrađeno je filogenetsko stablo. Stablo pokazuje da su HBoV 1 sekvence naših uzoraka blisko povezane sa sojevima izoliranim diljem svijeta (npr. Tunis, Japan, Kina, Nizozemska i SAD) kao što je prikazano na slici 47. Nije bilo filogenetskog grupiranja s obzirom na mono- ili koinfekcije odnosno godinu izolacije. Također je vidljivo da su sekvence blisko povezane, sa samo nekoliko nukleotida razlike, te se filogenetske loze nisu mogle sa sigurnošću razlikovati. Ovo je potvrđeno i na razini nukleotida i na razini aminokiselina. Identičnost naših uzoraka bila je u rasponu od 97,7–99,2 % nakon usklađivanja kodirajućih regija; VP3 kodirajuća regija je najmanje očuvana (tablica 19). Srodnost je veća na razini proteina: NP1 je bio potpuno očuvan, dok je NS1, najduži od NS proteina, imao pet varijabilnih mjesta. S obzirom na preklapanje kodirajućih regija, dvije od navedenih supstitucija su zajedničke NS1 i NS1-70 kraćem proteinu, kojem nedostaje C-kraj: varijacije na mjestima 580 (između Asp i Asn) odnosno 627 (Ala i Thr). NS1 je imao tri dodatna varijabilna mjesta na C-terminalnom dijelu koji ne dijeli s NS1-70 (Asn647Asp, Pro668Ser/Thr i Thr722Ala). Među VP proteinima, VP3 je imao samo dva varijabilna mjesta, na pozicijama 305 (Ser i Asn) i 461 (Ser i Thr). Kodirajuća regija VP1 je imala dodatno varijabilno mjesto izvan zajedničke regije s VP3, na poziciji 17 gdje su uočeni Arg i Lys (nije prikazano). Srednji VP protein, odnosno VP2, koristi nekanonski početni kodon (29) i nije analiziran zasebno jer je njegov niz je već pokriven analizom sekvenci VP1 i VP3 kodirajućih regija.

Tree scale: 0.1

HBoV-1



Slika 47. Filogenetsko stablo izoliranih sojeva HBoV

5.5.2. Procjena stopa evolucije

Za procjenu stopa evolucije uzeta su u obzir samo područja koja su u cijelosti kodirana. Za VP1 i VP3 proteine, ovo uključuje i zajednički dio. Izračunate stope evolucije pokazuju da sojevi HBoV 1 mutiraju u rasponu od 10^{-4} i 10^{-5} zamjene po mjestu i godini: NS1, NP1, VP1 i VP3 imali su sličnu srednju stopu evolucije, dok gen NS1-70 evoluirao brzinom na razini cijelog genoma (tablica 19). Među sekvencama iz ove studije rekombinacija nije otkrivena.

Tablica 19. Prikaz postotaka identičnosti nukleotida i stope zamjene za četiri gena HBoV 1 sojeva koji su uključeni u ovu studiju.

Gen	Identičnost nukleotida	Identičnost aminokiselinskog slijeda	Prosječna evolucijska stopa	95% HPD*
NS1	99,1 %	99,4 %	$1,07 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-8} - 2,6 \times 10^{-4}$
NS1-70	99,2 %	99,7 %		$7,4 \times 10^{-9} - 1,3 \times 10^{-4}$
NP1	98,9 %	100 %	$1,60 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-8} - 4,4 \times 10^{-4}$
VP1	97,9 %	99,6 %	$1,09 \times 10^{-4}$	$5,9 \times 10^{-9} - 2,3 \times 10^{-4}$
VP3	97,7 %	99,6 %	$1,18 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-9} - 3,3 \times 10^{-4}$
Kompletan genom	98,5 %	n.d.	$9,78 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-8} - 2,6 \times 10^{-4}$

*HPD- najkraći intervali među svim Bayesian vjerodostojnim intervalima, od engl. *highest posterior density*

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem utvrdili smo epidemiološke, virološke i kliničke osobitosti infekcija uzrokovanih HBoV u djece u sjeverozapadnoj Hrvatskoj te ispitali postoji li povezanost između težine kliničke slike i visoke koncentracije HBoV u nazofaringealnom sekretu oboljele djece, kako bismo pridonijeli boljem razumijevanju patogeneze akutnih respiratornih infekcija u djece te boljem dijagnostičkom pristupu ovom virusu. Dodatno smo usporedili klasični kvantitativni PCR s nekonvencionalnim načinom određivanja količine HBoV u uzorku MT-PCR metodom, kako bismo olakšali dijagnostiku ovog virusa u svakodnevnoj praksi.

6.1. Prevalencija HBoV

Naše istraživanje, koje je bilo prospektivno te uključilo djecu do 18 godina hospitaliziranu zbog akutne respiratorne infekcije gornjeg i donjeg dišnog sustava, rezultiralo je prevalencijom HBoV od 7,6 %. Akutne respiratorne infekcije su jedan od glavnih razloga hospitalizacije u dječjoj dobi, a različita istraživanja su pokazala da djeca imaju po pet i više epizoda respiratornih infekcija godišnje (126). Podaci iz svjetske literature govore da je HBoV jedan od češćih respiratornih virusa u djece. Guido je u svom radu procijenio globalnu prevalenciju HBoV infekcije na 6 % (4), dok je Polo u svojoj meta-analizi istraživanja sa područja Europe iznio podatak o nešto višoj prevalenciji, gotovo 10 %. Pri tom je pokazao da prevalencija u pojedinim istraživanjima varira, što se može pripisati različitom dizajnu studija, osobito različitoj dobi ispitanika (62). Dosadašnji podaci o učestalosti infekcije uzrokovane ovim virusom u Hrvatskoj rezultat su dviju studija: studije iz 2016. godine provedene među djecom hospitaliziranom zbog ARI, gdje je prevalencija iznosila 10,3 %, te druge retrospektivne studije iz 2018. godine u kojoj je prevalencija HBoV-a bila značajno viša, čak 23,1 % (63, 64). Glavni razlozi diskrepance u prevalenciji između navedenih studija su njihov različit dizajn. Naime, osim što je studija iz 2018. godine bila retrospektivna, rađena je na kliničkim uzorcima male djece do tri godine koja su imala dokazanu IDDS (bronhitis, bronhiolitis i pneumoniju), dok je prospektivna studija iz 2016. uključila djecu do 16 godina s IGDS i IDDS. Već su ovi rezultati dali naslutiti da je HBoV značajan uzročnik IDDS kod male djece.

U ovom istraživanju provedena je stratifikacija prevalencije po dobnim skupinama te je dokazano da prevalencija HBoV snažno ovisi o dobi djece. Medijan dobi bolesnika pozitivnih na HBoV bio je 16 mjeseci (najmlađe dijete imalo je sedam dana, a najstarije 15 godina). Najveći broj HBoV inficirane djece je bilo u dobi od jedne do tri godine, njih 62 %, jedna četvrtina djece s dokazanim HBoV je bila mlađa od jedne godine, dok je samo 5 % djece bilo

starije od pet godina. To je u skladu s podacima iz drugih studija koje su pokazale da se primoinfekcija HBoV događa u ranoj dječjoj dobi. Studija iz 2018. godine koja je pratila kohortu zdrave djece tjednim testiranjem na respiratorne patogene kroz prve dvije godine života je pokazala da je medijan prvog detektiranja HBoV 16 mjeseci (127), dok je u studiji Martin i sur. medijan inicijalnog zaražavanja HBoV virusom iznosio 11 mjeseci (128).

Prevalencija infekcija uzrokovanih drugim respiratornim virusima dijagnosticiranim u ovom istraživanju je također varirala s dobi, izuzev onom uzrokovanom rinovirusima. Naime, HRV je bio najčešće detektirani virus u svim dobnim skupinama, a prevalencija mu se kretala od 34 do 38 %. Čini se da je HRV značajan uzročnik ARI tokom cijelog života. Podaci iz našeg istraživanja pokazuju da je u djece mlađe od godinu dana drugi najčešće detektirani virus bio RSV, koji je zabilježen u jedne trećine testirane dojenčadi, dok je prevalencija ovog virusa u djece starije od pet godina iznosila manje od 4 %. To je u skladu s podacima iz Houston Family studije koja je izvijestila da 68 % promatrane djece do godinu dana ima protutijela na RSV virus, a gotovo sva djeca dođu u kontakt s ovim virusom do svog drugog rođendana (129).

Za razliku od RSV-a, infekcija HBoV se čini se događa ipak nešto kasnije u životu, nakon 6 mjeseci, što bi moglo biti vezano uz visoku seroprevalenciju HBoV antitijela u odrasloj dobi, te je moguće je da majčinska antitijela igraju zaštitnu ulogu u prvih nekoliko mjeseci života. Seroepidemiološka istraživanja također govore u prilog zaražavanja ovim virusom u prvim godinama života. Prema tim podacima više od 85 % djece starije od četiri godine ima protutijela na ovaj virus (130). Meriluoto i sur. pokazali su da se primarni imunoodgovor na HBoV događa nakon prvih šest mjeseci života te da su u dobi od šest godina praktički sva djeca bila inficirana ovim virusom. Dvije trećine djece održavale su stabilne razine IgG protutijela tijekom više godina nakon serokonverzije. Međutim, kod četvrtine djece razina protutijela značajno se smanjila s vremenom, u nekim slučajevima ispod granice detekcije. Ipak, kod većine djece s takvom dinamikom protutijela, IgG protutijela na HBoV 1 kasnije su se ponovno mogla detektirati. Sekundarne imunoreaktivacije bile su visoke avidnosti, bez prisutnosti IgM protutijela i bez viremije. Autori ove studije zaključuju da vjerojatno ovi događaji predstavljaju sekundarne infekcije HBoV 1, tijekom kojih su kliničke slike bile blaže te je vjerojatno infekcija ostala lokalizirana (131). Budući da je naše istraživanje provedeno na kohorti djece koja su zahtijevala bolničku skrb, uočen mali broj starije djece pozitivne na HBoV vjerojatno je odraz blažih kliničkih slika u tijekom reinfekcije koje nisu iziskivale hospitalizaciju.

6.2. Sezonska pojavnost HBoV

Naše istraživanje provedeno je tijekom četiri godine kako bi se dobio uvid u sezonsku pojavnost ovog virusa. Tijekom sve četiri promatrane godine vrhunac pojavnosti infekcija HBoV-om dogodi ose tijekom zimskih mjeseci, s postupnim povećanjem broja pozitivnih uzoraka od studenog do veljače i postupnim smanjenjem od ožujka do listopada. Najmanje uzoraka s detektiranim HBoV bilo je tijekom ljetnih mjeseci lipnja, srpnja i kolovoza. To se poklapa i s dosadašnjim podacima iz literature o sezonskoj pojavnosti ovog virusa u umjerenom klimatskom pojasu (2). Bagasi i sur. su zabilježili vrhunac pojavnosti HBoV sredinom veljače, a sezonu pojavljivanja od studenog do travnja (111). Međutim, treba uzeti u obzir i mogućnost dugotrajnog izlučivanja ovog virusa koja može zamagljivati pravu sliku. Iz tog razloga su izdvojeni uzorci s visokom koncentracijom virusa, te uočeno da su takvi uzorci detektirani na početku respiratorne sezone, u studenom i prosincu, što bi preciznije ukazivalo da su to mjeseci u kojima se češće pojavljuje HBoV.

6.3. Klinička slika djece s dokazanim HBoV

I u našoj studiji je broj testiranih dječaka bio nešto veći u odnosu na djevojčice, a učestalost otkrivanja HBoV infekcije je pratila raspodjelu testirane djece po spolu, što je u skladu s podacima iz drugih studija gdje je također obolijevalo više dječaka (132). U brojnim istraživanjima respiratornih infekcija pokazano je da dječaci nešto češće obolijevaju od djevojčica.

U djece s dokazanim HBoV, infekcija je u 40 % njih zahvatila samo gornji dišni sustav, a 60 % djece je imalo infekciju donjeg dišnog sustava. Glavni razlog dolaska u bolnicu bilo je otežano disanje, povišena temperatura i kašalj. Među djecom sa zahvaćenim gornjim dišnim sustavom dominirala je slika febrilnog respiratornog katara te slika akutne upale srednjeg uha, a u slučajevima IDDS najčešća prezentacija je bila pneumonija, u nešto više od trećine, te bronhitis u jedne četvrtine djece. To je u skladu s drugim studijama koje su rađene na populaciji hospitalizirane djece, kako navodi Christensen (72). Dodatno, studija japanskih autora je pokazala da je oporavak djece od akutne upale uha duži u slučaju pozitivnog nalaza HBoV te da HBoV infekcija može prethoditi sekundarnoj bakterijskoj infekciji srednjeg uha koju uzrokuje *S. pneumoniae* (83). Na fizikalnom pregledu dvije trećine naše djece je bilo eupnoično, a u jedne trećine djece je dominirao nalaz dispneje, od čega je u 13 slučajeva bila prisutna tahidispneja s korištenjem pomoćne dišne muskulature. Auskultacijski nalaz bio je abnormalan u 44% djece, od čega je najčešće čujan fenomen bio sipnja, što je u skladu s dosadašnjim podacima iz literature koji su pokazali da je HBoV treći najčešći virus dokazan u

djece sa sipnjom nakon humanog rinovirusa i RSV-a (133). Od manifestacija izvan dišnog sustava najčešće su bile prisutne kožne promjene, u 13,7 % slučajeva, dok je 4 % djece inicijalno povraćalo ili imalo proljev.

6.4. Predliježeće bolesti u djece s dokazanim HBoV

U gotovo petine djece s dokazanim HBoV zabilježene su predliježeće bolesti. Većina takve djece je imala malformacije kardiovaskularnog i probavnog sustava, dok je po jedno dijete imalo kromosomske abnormalnosti, kožnu mastocitozu i cističnu fibrozu. Usporedivši koncentraciju HBoV, pokazano je da djeca s predliježećim bolestima češće imaju visoku koncentraciju HBoV u odnosu na prethodno zdravu djecu ($p=0,017$ za sve HBoV pozitivne, odnosno $p=0,045$ za monodetekcije HBoV-om). To je u skladu s izvještajem Christensena i sur. koji navode rizične faktore koji bi mogli utjecati na težinu bolesti kod djece s HBoV: kardiopulmonalne bolesti, prematuritet sa kroničnom plućnom bolesti, malignu bolest i imunosupresiju (72). Ghiotto i sur. u studiji iz 2016. godine, u kojoj je bio još viši postotak komorbiditeta (31 %) kod HBoV pozitivne djece, zaključuju da su djeca s komorbiditetima osjetljivija na infekciju HBoV, te očito interakcija virus-domaćin igra ulogu u razvoju teže kliničke slike (134).

6.5. Učestalost kodetekcije humanog bokavirusa s drugim virusima

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost kodetekcije HBoV s drugim virusima što je jedna od glavnih osobitosti HBoV infekcije. Učestalost kodetekcije u različitim studijama u literaturi kretala se od 14 do 100 %, ovisno o dizajnu studije (62). Sukladno dosadašnjim nalazima, i u našoj studiji HBoV je detektiran u visokom postotku u kodetekciji s drugim respiratornim virusom, u preko 80 % slučajeva. Visoka učestalost kodetekcije ovog virusa s drugim virusima objašnjava se specifičnim obilježjima HBoV, kao što je npr. njegovo dugotrajno izlučivanje iz stanice, prema nekim autorima i do 402 dana (66, 135). Wagner i sur. su opisali nekoliko načina izlučivanja HBoV iz stanica: a) rješavanje virusne infekcije unutar mjesec dana (engl. *viral clearance*) bez rekurencije nakon prve epizode, b) prolongirana prisutnost virusa (od 30 do 60 dana), c) intermitentna detekcija unutar šest mjeseci od infekcije i d) rekurencija nakon više uzastopno negativnih nalaza. Autori su zaključili da je otkrivanje HBoV 1 DNA u dišnim putevima često rezultat produljenog prisustva ili povremenog izlučivanja, a rijetko se radi o novostečenoj infekciji te su pokazali da se djeca rijetko inficiraju s dvije različite genetske linije HBoV 1 unutar jedne godine (59).

S druge strane, djeca tijekom prvih godina života imaju i do 10 različitih respiratornih infekcija u jednoj godini (136), te se uzročnici preklapaju, zbog čega se osjetljivim molekularnim

metodama često mogu detektirati dva i više uzročnika u istom uzorku. Sukladno tome, i u našem istraživanju je u čak trećini ispitanika s dokazanom virusnom etiologijom detektirano dva i više virusa, a medijan dobi kod takve djece je bio 10,8 mjeseci, dakle radilo se o djeci koja su vjerojatno već izložena nekom obliku kolektiva. U odnosu na druge respiratorne viruse, utvrđeno je da se HBoV značajno češće detektira u kombinaciji s drugim virusom nego virus influence, adenovirus, RSV, dok statistički značajne razlike u kodetekciji nije bio u slučaju enterovirusa i sezonskih koronavirusa.

Iz osobitosti HBoV infekcije, od čega je najprominentnija česta kodetekcija HBoV s drugim respiratornim virusom, jasno je da oslanjanje samo na kvalitativni PCR nije dovoljno za definitivnu dijagnozu akutne HBoV infekcije. U literaturi predložene dodatne metode su kvantitativni PCR, detekcija mRNA i serologija (72). Serološka dijagnostika je zahtjevna iz više razloga. Jedan je nepostojanje standardiziranih seroloških testova, te su istraživanja rađena uglavnom različitim *in house* metodama (68). S druge strane tumačenje nalaza je otežano zbog postojanja četiri tipa virusa, HBoV 1-4, koji uzrokuju imunološku križnu reaktivnost i fenomen poznat pod nazivom izvorni antigeni grijeh (engl. *original antigenic sin*) (137). Druga mogućnost je kvantitativni PCR, gdje bi visoka koncentracija virusa bila pokazatelj akutne infekcije, ili dokaz aktivne replikacije virusa detekcijom specifične mRNA. Međutim, granica između visoke i niske koncentracije virusa nije jednoznačno postavljena. Neki autori sugeriraju da je virusno opterećenje iznad 10^4 kopija/mL značajno (68, 106) dok druga istraživanja ukazuju da je za akutne virusne infekcije prikladnije postaviti prag iznad 10^6 kopija/ml virusne DNA u nazofaringealnom sekretu (72). Kvantitativni PCR u odnosu na test koji detektira mRNA ima osjetljivost od 100 %, specifičnost od 93-99 % i pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) od 56-87 % (72, 138). U usporedbi sa serologijom, osjetljivost kvantitativnog PCR testa bila je 81 %, specifičnost 92 %, a PPV 87 % (139).

6.6. Koncentracija HBoV u djece s infekcijom gornjeg i donjeg dišnog sustava

S obzirom na hipotezu, najvažniji cilj našeg istraživanja bio je utvrditi koncentraciju HBoV u pozitivnim uzorcima te usporediti koncentraciju HBoV virusa u djece koja su razvila kliničku sliku infekcije donjeg dišnog sustava s koncentracijom virusa u djece kod koje je infekcija ostala lokalizirana u gornjim dišnim putevima. Detektiran je široki raspon vrijednosti koncentracije, od svega 9,71 kopija/ml do uzorka sa preko 10^7 kopija virusnih čestica/ml. U sedam uzoraka koji su inicijalno bili pozitivni multipleks PCR-om, kvantitativni PCR je bio negativan. Vjerojatno se radilo o uzorcima u kojima je HBoV bio u vrlo maloj količini te je moguće da je tako mala količina virusne DNA degradirala tijekom perioda čuvanja, premda su

uzorci bili smrznuti na -80 C. Statističkom analizom nije potvrđena značajna razlika u koncentraciji u sve HBoV pozitivne djece (n=73) u odnosu na lokalizaciju infekcije, dakle uključivši i slučajeve kad je uz HBoV bio prisutan još neki dodatni patogen. Međutim, kad su izdvojena djeca koja su imala detektiran samo HBoV (n=13), dokazano je da su koncentracije virusa kod takve djece značajno veće u slučajevima infekcije donjeg dišnog sustava. Analiza uzoraka u kojima je HBoV bio jedini dokazani patogen je pokazala da je ovaj virus bio prisutan u niskoj koncentraciji u većini slučajeva gdje je infekcija ostala lokalizirana na gornje dišne puteve, dok je u gotovo svim slučajevima djece koja su razvila infekciju donjeg dišnog sustava HBoV detektiran u visokoj koncentraciji, i to većoj od 10^6 kopija/ml.

Ni kod jednog od ove djece rutinskom mikrobiološkom obradom nije dokazan bakterijski patogen. Trenutno su CRP i prokalcitonin (PCT) najbolji rutinski dostupni biomarkeri za predviđanje bakterijemije kod djece s upalom pluća, što je pokazalo i veliko retrospektivno istraživanje iz Francuske provedeno na preko 13 000 djece (140). Istraživanje Harana i sur. također je pokazalo da je CRP koristan marker u predviđanju bakterijske infekcije kod bolesnika koji se javljaju u hitnu službu s akutnim respiratornim simptomima. U tom kontekstu, CRP manji od 20 mg/l ima osjetljivost od 100 %, dok CRP veći od 80 mg/l ima specifičnost za bakterijsku infekciju od 100 % (141). U studiji Moeskera i sur. istraživači su razvili algoritam kako bi isključili druge moguće bakterijske uzročnike uz HBoV, za djecu koja su razvila tešku respiratornu infekciju koja je zahtijevala intenzivno liječenje. Algoritam je uključivao granicu CRP-a od 40 mg/l kao kriterij za procjenu vjerojatnosti bakterijske infekcije (142). Prema tom kriteriju, dvoje naše djece s monodetekcijom HBoV imalo je CRP viši od 40 mg/l te po tome moguće, ali nedokazanu bakterijsku koinfekciju, dok je 11 djece imalo CRP niži od 40 mg/l, što snažno govori protiv moguće bakterijske koinfekcije.

6.7. Antimikrobna terapija u djece s HBoV

U našem radu zabilježeno je 36 djece s HBoV infekcijom koja su bila empirijski liječena antimikrobnim lijekom, pri čemu su najčešće bili korišteni antibiotici širokog spektra, cefalosporin treće generacije i kombinacija amoksicilina s inhibitorom betalaktamaze. Koncentracije HBoV-a kod te djece su bile značajno više nego kod djece pozitivne na HBoV za koju se nadležni liječnici nisu odlučili za uvođenje antibiotske terapije, što bi također govorilo u prilog tome da su djeca s višom koncentracijom HBoV imala težu kliničku sliku. Kod 20 djece su uzeti uzorci krvi za hemokulturu, od čega je u jednog djeteta dokazan *S. pneumoniae*, što se može smatrati definitivnom potvrdom bakterijske pneumonije. U jednoj hemokulturi je dokazan koagulaza-negativni stafilokok, koji je kod imunokompetentne djece

vjerojatno posljedica kontaminacije fiziološkom florom kože. U jednog djeteta je u urinu bila prisutna *E. coli* u velikom broju, a kod jednog djeteta je u brisu ždrijela dokazan *S. pyogenes*. Kod dvoje djece je zabilježen pozitivan bakteriološki nalaz obriska nazofarinksa.

Akutne respiratorne infekcije su jedan od vodećih razloga propisivanja antibiotika u izvanbolničkoj populaciji. Ovo potvrđuju i podaci Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, koja od 2001. godine prati rezistenciju bakterija i potrošnju antibiotika u Hrvatskoj. Naime, u izvještajima za izvanbolničku populaciju među prvih deset dijagnoza za koje se propisuju antibiotici sedam njih su dijagnoze iz područja respiratornog sustava (akutna upala sinusa; akutna upala ždrijela, akutna upala tonzila, akutna upala gornjeg dišnog sustava, akutni bronhitis, periapikalni apsces bez sinusa), što govori u prilog tezi da se antibiotici često neopravdano propisuju u liječenju virusnih infekcija. Štoviše, za liječenje pacijenata s dijagnozom infekcija respiratornog sustava, koje su dominantno virusne etiologije, potrošeno je dvostruko više antibiotika nego za liječenje infekcija mokraćnog sustava, koje su najčešće izvanbolničke bakterijske infekcije (143).

S obzirom na navedeno, točna dijagnostika infekcija respiratornog trakta je važna kako bi se na taj način utjecalo na smanjenje neopravdane upotrebe antibiotika i posljedično razvoja i širenja antibiotske rezistencije.

Premda je učestalost kodetekcije HBoV i drugih respiratornih virusa visoka i dobro opisana u brojim studijama, o učestalosti detekcije HBoV i bakterijskih respiratornih patogena nema puno podataka. Studija iz 2022. godine koja je koristila osjetljive molekularne metode detekcije je otkrila istodobno prisustvo HBoV i bakterijskog patogena u 70 % uzoraka gornjeg dišnog sustava testirane djece s akutnom respiratornom infekcijom, međutim nije razjasnila radi li se o infekciji, kolonizaciji ili eventualnoj kontaminaciji (144). Interakcije bakterijskih i virusnih patogena u infekcijama dišnog sustava i dalje ostaju nejasne. Do sada se smatralo da virusne infekcije predisponiraju sekundarne bakterijske infekcije. Dok je kod odraslih i kod djece ta veza dobro utvđena i opisana za interakciju virusa influence i *S. pneumoniae*, čini se da bi kod djece interakcija drugih respiratornih virusa i bakterija mogla biti dvosmjerna. Studija iz Južne Afrike je pokazala da se upotrebom 9-valentnog pneumokoknog cjepiva preveniralo 31 % virusnih pneumonija (145), dok je druga studija pokazala da je nazofaringealno nosilaštvo *S. pneumoniae* bilo povezano s češćom serokonverzijom HMPV-a (146). Dodatni dokazi koji idu u prilog teoriji da bakterije mogu promovirati virusnu infekciju su studije koje su pokazale da sintetski bakterijski lipopeptidi olakšavaju vezivanje RSV-a i HMPV na stanice dišnog epitela,

dok je za *H. influenzae* pokazano da povećava ekspresiju ICAM-1 i TLR3 molekula na dišnom epitelu i na taj način poboljšava vezanje rinovirusa i posljedično otpuštanje kemokina (147). Svi ovi primjeri pokazuju da stara paradigma o virusima koji predodređuju sekundarne bakterijske bolesti je jednosmjerno i pojednostavljeno postavljena te da još treba istražiti dinamiku interakcija između bakterija i virusa u infekcijama dišnog sustava (148).

Dosadašnje studije su pokazale da pozitivan virološki nalaz kod febrilne djece s respiratornim simptomima ima ograničen utjecaj na propisivanje antibiotika, pri čemu je jedan od problema ispravno tumačenje pozitivnog nalaza (149). Studija autora iz Kanade je zaključila da se brzo testiranje na širok spektar virusa ne čini samo po sebi korisnim za intervencije vezane uz racionalno korištenje resursa kod hospitaliziranih odraslih pacijenata, osim ako se ne može kombinirati s dodatnim načinima isključivanja bakterijskih koinfekcija. U njihovoj studiji je jedino pozitivan nalaz na virus gripe imao značajan utjecaj na smanjenje korištenja antibiotika (150). S druge strane, u opservacijskoj studiji Keske i sur. su uočili da se trajanje primjene antibiotika značajno skratilo nakon otkrivanja virusa, kako kod djece tako i kod odraslih (151). U našoj studiji je pokazano da je visoka koncentracija HBoV virusa povezana s češćom upotrebom antibiotika, međutim potrebne su daljnje studije koje bi razjasnile može li podatak o koncentraciji HBoV pomoći kliničarima u smanjivanju prekomjernog korištenja antibiotika u terapiji virusnih respiratornih infekcija.

6.8. Respiratorna insuficijencija i potreba za nadomjesnim liječenjem kisikom u djece s dokazanim humanim bokavirusom

Jedan od promatranih pokazatelja težine kliničke slike kod djece s detektiranim HBoV je bio razvoj respiratorne insuficijencije te potreba za nadoknadom kisika u tijeku liječenja. Saturacija arterijske krvi kisikom mjerena je u 88 % djece s dokazanim HBoV, a u 14% djece je bila niža od 92 % te je kod te djece bila potrebna respiratorna potpora i suplementacija kisika. U devet od deset uzoraka takve djece dokazana je visoka koncentracija HBoV, od čega u osam slučajeva viša od 10^6 kopija/ml. Statističkom analizom je pokazano da su koncentracije HBoV kod djece na terapiji kisikom značajno više nego kod djece koja nisu trebala nadoknadu. Hipoksemija je česta kod djece s infekcijom donjih dišnih puteva, a SpO₂ <94 % prisutan je kod 73 % djece mlađe od jedne godine koja su primljena u bolnicu zbog akutnog bronhiolitisa u razvijenim zemljama. Nadalje, kod starije djece s upalom pluća u zemljama u razvoju, hipoksemija (SpO₂ <90 %) prisutna je kod 13 % slučajeva (152).

Međutim, vezu između HBoV i razvoja hipoksemije zamagljuje česta kodetekcija HBoV s drugim virusom. U dvoje djece s hipoksemijom HBoV bio jedini dokazani patogen i to u oba

slučaja prisutan u visokoj koncentraciji. U ostalih osmero djece pozitivnih na HBoV koji su liječeni nadoknadom kisika, HBoV je bio prisutan zajedno s drugim virusom, od čega najčešće s rinovirusom. Analizom tih uzoraka MT-PCR metodom je utvrđeno da u uzorku u kojem je HBoV bio prisutan u maloj koncentraciji, dominira RSV virus, te bi se u tom slučaju hipoksemija i potreba za nadoknadom kisika mogla pripisati RSV-u. Međutim, u ostalim uzorcima u kojima je HBoV bio u kodetekciji s drugim virusom u podjednakoj količini, ostaje nejasno koji je virus pravi uzročnik ili se radi o sinergističkom djelovanju. Međutim, dokaz HBoV-a u visokoj koncentraciji kod hipoksemične djece, osobito u dva slučaja monodetekcije, pokazuje da ovaj virus ima patogeni potencijal izazvati infekciju donjeg dišnog sustava težeg kliničkog tijeka.

To je djelomično objašnjeno na molekularnoj razini. Naime, HBoV, premda ima vrlo mali genom te kao takav koristi staničnu mašineriju za svoje umnažanje, ima vrlo dovitljive mehanizme replikacije. Jedan od dokazanih molekularnih mehanizama je aktivacija staničnih mehanizama popravka DNA, takozvani DDR (od engl. *DNA damage response*) i uvođenje stanice u programiranu staničnu smrt procesom piroptoze (37, 50). Piroptoza je relativno nedavno otkriveni oblik programirane stanične smrti, koji za razliku od apoptoze, rezultira formiranjem pora na staničnoj membrani i gubitkom staničnog integriteta te lučenjem proupalnih citokina. Utvrđeno je da je piroptoza česta pojava u infektivnim i upalnim bolestima dišnih puteva kao što su akutna ozljeda pluća, displazija bronha, kronična opstruktivna plućna bolest i astma. Pretjerana piroptoza može pratiti upalu dišnih putova, oštećenje tkiva i oštećenje dišnih putova te izazvati upalnu reakciju, što dovodi do jačeg oštećenja i lošije prognoze bolesti dišnih puteva (135).

Virusne infekcije su važan uzrok pedijatrijskog akutnog respiratornog distres sindroma (PARDS). Brojni virusi su povezani s progresijom infekcije donjeg dišnog sustava u ARDS, od čega su najbolje opisani RSV i influenza. Prema dostupnim podacima u našoj studiji od 957 testirane djece zabilježeno je 22 djece koja su tijekom hospitalizacije razvila sekundarni ARDS, od čega je 12 njih zahtijevalo mehaničku ventilaciju.

Među djecom koja su razvila ARDS u našoj studiji najčešće detektirani virus je bio humani rinovirus u gotovo polovni slučajeva, a zatim su slijedili adenovirus i RSV. Prema studiji Roberts i sur. iz 2019. pneumonija je kod djece bila najčešći uzrok ARDS-a uopće, pri čemu su virusi jedini detektirani patogeni u 50 % slučajeva. U toj studiji najčešće detektirani virus kod djece s razvijenim ARDS-om je također je bio rino/enterovirus, međutim u 68 % uzoraka

u kodetekciji s drugim virusom(153). Druga studija koja je pratila bolesnike s bronhiolitisom iz 2015. godine u 90 % slučajeva PARDS-a je potvrdila virusni patogen, pri čemu je RSV bio najčešći, pronađen u 51 % slučajeva, zatim je slijedio rinovirus (28 %) te humani metapneumovirus (13 %) (154).

Ni jedno dijete s detektiranim HBoV u našoj studiji nije razvilo ARDS niti je bilo na mehaničkoj ventilaciji. Međutim, jedno dijete je zahtijevalo boravak u jedinici intenzivnog liječenja zbog pneumonije i prolongirane bronhoopstrukcije. Radilo se o jednogodišnjem dječaku u akutnoj respiratornoj insuficijenciji uzrokovanoj teškom bronhoopstrukcijom i obostranom pneumonijom. Po primitku je započeta učestala inhalacijska terapija salbutamolom i ipratropij bromidom uz kortikosteroide parenteralno i oksigenoterapiju. Drugi dan boravka djeteta dolazi do pogoršanja respiratornog statusa, produbljenja hipoksemije, zahtjeva sve veću suplementaciju O₂ te se pod slikom parcijalne respiratorne insuficijencije premješta u jedinicu intenzivnog liječenja na daljnje liječenje. Tijekom četverodnevnog boravka u jedinici intenzivnog liječenja provedena je terapija visokim protokom zraka putem nosne kanile (HFNC, od engl. *High Flow Nasal Canula*) uz kontinuiranu infuziju aminofilina, oseltamivir *per os* kroz tri dana, ceftriakson intravenski, kortikosteroide parenteralno i nastavljene učestale inhalacijske terapije. Postupno dolazi do poboljšanja respiratornog statusa te se nastavlja liječenje na odjelu do oporavka plućne funkcije. Kod otpusta dječak je bio afebrilan, eupnoičan i poboljšanog auskultacijskog nalaza nad plućima. Multipleks PCR-om dokazan je samo HBoV, dok je rutinskim testiranjem koje je provedeno na odjelu kod djeteta detektiran virus influence A. Takva diskrepanca u nalazu bi se mogla objasniti razlikom u specifičnosti i osjetljivosti korištenih testova, s obzirom da su uzorci obriska nazofarinksa za obje pretrage uzimani unutar prvih pet dana od početka simptoma. Kvantitativnim PCR-om potvrđen je HBoV i utvrđena koncentracija HBoV je bila viša od 10⁶ kopija/ml. Stoga vjerujemo da je stvarni uzročnik teške kliničke slike bio HBoV, a ne virus influence koji nije bio potvrđen osjetljivijom i specifičnijom molekularnom metodom. U prilog ovakvom tumačenju značaja nalaza visoke koncentracije HBoV u uzorku ovog djeteta ide i studija Moeskera i sur. koji su izvijestili o visokom virusnom opterećenju kod sedam pacijenata primljenih na odjel intenzivne njege te zaključili da je monoinfekcija HBoV uzrokovala tešku akutnu respiratornu infekciju u ove djece (142). U literaturi su opisani i pojedinačni teški oblici respiratorne infekcije s HBoV koji su zahtijevali korištenje intenzivne njege u prethodno zdrave djece (90, 155, 156).

6.9. Duljina hospitalizacije djece s dokazanim HBoV

Duljina hospitalizacije važan je parametar u procjeni težine bolesti bolesnika s ARI, pa i kod djece s dokazanim HBoV. U našoj studiji djeca s pozitivnim nalazom HBoV boravila su kraće od djece s drugim respiratornim virusom. Međutim, djeca s visokom koncentracijom HBoV su boravila duže od djece s niskom koncentracijom virusa ($p=0,04$). Kad su izdvojena djeca s monoinfekcijama HBoV, nije bilo statističke razlike u duljini boravka u bolnici. Spearmanov koeficijent korelacije je bio nizak, što upućuje na slabo pozitivno monotonu vezu između tih varijabli. Vjerojatno na duljinu hospitalizacije utječe cijeli niz drugih faktora, kao što je to i u slučaju drugih uzročnika ARI. Primjerice, studija koja je proučavala duljinu hospitalizacije djece s RSV-om je pokazala da varijable koje predviđaju produženo trajanje boravka kod RSV-a uključuju mlađu dob, premještaj iz druge ustanove, intubaciju, komorbiditete, ali isto tako i tip i lokaciju bolnice (157).

6.10. Usporedba kvantitativnog PCR-a na HBoV i multipleks tandem PCR-a

U ovom radu uspoređen je kvantitativni PCR za HBoV s MT-PCR-om, oblikom ugniježđenog (engl. *nested*) PCR-a na poluautomatiziranom sustavu. Iako MT-PCR ne pruža informaciju o točnom broju kopija (engl. *viral load*) kao što to radi kvantitativni PCR, to je u svojoj prirodi kvantitativna metoda (158), a rezultate prikazuje kao intenzitet umnoženog signala koji je graduiran od jedne do pet zvjezdica za svaki patogen. Uspoređeni su rezultati za HBoV s rezultatima kvantitativnog PCR-a i dobivena visoka kongruencija: 25 od 28 uzoraka s visokom koncentracijom HBoV-a u kvantitativnoj PCR reakciji (više od 10^4 kopije/mL) imalo je intenzitet 4-5 zvjezdica na izvješću MT-PCR-a za taj virus. Dodatna statistička analiza je pokazala visoku razinu poklapanja dvaju metoda, a izračunati Pearsonov i Spearmanov koeficijent pokazuju postojanje linearne veze između ove dvije metode te bi se rezultat MT-PCR metode, iskazan kao intenzitet virusa, mogao koristiti kao alternativa klasičnom određivanju koncentracije HBoV kvantitativnim PCR-om te bi se na taj način moglo olakšati tumačenje pozitivnog nalaza HBoV.

Deset uzoraka pozitivnih na HBoV multipleks PCR testom bili su negativni na MT-PCR testu, ali za sedam od njih, kvantitativni PCR je također bio negativan, dok su dva uzorka imala vrlo mali broj kopija HBoV-a, manje od 50 kopija. MT-PCR ima endogenu kontrolu ekstrakcije i amplifikacije, (engl. *Sample Adequacy*), koja cilja ljudski referentni gen koji služi kao pokazatelj adekvatnosti uzorka i uspješne ekstrakcije nukleinskih kiselina. Kontrola inhibicije, nazvana SPIKE, također je bila pozitivna, stoga negativan rezultat MT-PCR testa nije mogao biti objašnjen inhibicijom PCR reakcije. Niska količina virusne DNA u uzorku moguće je

rezultat degradacije tijekom vremena uslijed produljenog zamrzavanja i višestrukog otapanja uzoraka ili nespecifičnosti multipleks PCR-a.

Sljedeće, većina praktičara i dalje pristupa respiratornim infekcijama pretpostavljajući jedan etiološki uzrok. Međutim, osjetljive molekularne metode su otkrile da u istom uzorku može biti prisutno više patogena, čak i u slučajevima influence ili infekcije virusom respiratornog sincicijskog virusa (159), ali utjecaj takve kodetekcije na težinu respiratornih bolesti još uvijek nije jasan (160, 161). Slučajeve kodetekcije u kojima je prisutan HBoV zajedno s drugim virusima podijeljeni su u četiri grupe kako bi se vidjelo postoji li između njih razlika u kliničkoj prezentaciji. Očekivalo bi se da će bolesnici s visokom koncentracijom HBoV i visokim intenzitetom drugog respiratornog virusa imati težu kliničku prezentaciju, kao što neka istraživanja sugeriraju (162-164) te češće razvijati infekciju donjeg dišnog sustava (IDDS). Nasuprot tome, druga istraživanja, kao što je npr. multicentrična slučaj-kontrola studija iz 2017. godine s neodređenim rezultatima, dovode u pitanje takva saznanja (165). U našoj studiji nije utvrđena značajna razlika s obzirom na lokalizaciju infekcije u dišnom putu između grupa pacijenata podijeljenih prema broju detektiranih virusa u uzorcima iz nazofarinksa, iako je detaljna analiza bila ograničena malim brojem ispitanika u svakoj od skupina.

Napredak u dijagnostici, osobito razvoj platformi za amplifikaciju nukleinskih kiselina, značajno je poboljšao detekciju respiratornih virusnih patogena. S druge strane, visoka osjetljivost takvih molekularnih metoda omogućila je učestalo otkrivanje kodetekcije više patogena. Stoga je jedan od glavnih izazova moderne virologije razlikovanje uzročnika infekcije od asimptomatskog nosilaštva. Potrebne su daljnje studije kako bi se razjasnio klinički značaj kodetekcije respiratornih virusa.

6.11. Genotipizacija HBoV

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je odrediti kojem genotipu pripadaju sojevi HBoV virusa koji cirkuliraju na istraživanom području. Sekvenciranje i filogenetska analiza provedeni u ovom istraživanju pokazuju da svi sojevi pripadaju HBoV 1 virusu. Ovi rezultati se podudaraju s drugim studijama koje su pokazale da je HBoV 1 primarno respiratorni patogen, dok su HBoV 2-4 prisutni u gastrointestinalnim infekcijama (166, 167). Iako se HBoV 2-4 virusi mogu otkriti i u respiratornim uzorcima u određenim postotcima (0,4–4,3 %), njihova uloga u respiratornim bolestima još uvijek nije jasna (168). Ipak, prilikom sastavljanja sekvenci i izrade filogenetskog stabla uzeti su u obzir i uključeni u analizu. Nije bilo filogenetskog grupiranja temeljenog na godini izolacije.

Od 29 sekvenciranih uzoraka, amplifikacija gotovo cijelog genoma u jednoj reakciji bila je uspješna kod pet uzoraka, neovisno o tome je li HBoV otkriven kao jedini virus ili je otkriven u kodetekciji s više respiratornih virusa. Bilo je teško dobiti dugačke PCR produkte zbog složenosti i kvalitete kliničkih uzoraka, iako su naše početnice ciljale konzervirane regije na pozicijama koje su nam omogućile podjelu genoma u tri dijela. To je bilo najuočljivije kod četiri uzorka (HR1223-20, HR142-17, HR387-18, HR421-18), koji su imali mnogo manju pokrivenost. Ostatak očitane sekvence uglavnom je bio odraz ljudske DNA. Ipak, s pristupom podjele genoma na tri manja segmenta, uspješno su sekvencirana 24 uzorka, a dodatnih pet uzoraka sadržavalo je dva od tri segmenta genoma.

Analiza razlike u nukleotidima pokazuje ograničenu heterogenost između uzoraka, pri čemu su primijećene samo male razlike između pojedinih gena. U skladu s prethodnim studijama (169), geni koji kodiraju nestrukturane proteine su više konzervirani od kapsidnih proteina, koji se vežu na površinske stanične receptore i odgovorni su za prijenos genoma u jezgru (4). Osim toga, VP3 protein (ranije nazvan VP2) je glavna antigena determinanta (54); stoga se očekuje da će biti više varijabilan, a mutacije i rekombinacija glavni pokretači evolucije virusa (170).

Od pet supstitucija u NS1 proteinu pronađenih u našim uzorcima, dvije se nalaze u srednjoj helikaznoj domeni, ali izvan četiri konzervirana Walkerova motiva koji obavljaju funkciju helikaze 3'-5'. Tri zamjene nalaze se u C-terminalnom dijelu NS1 proteina, za koji se pretpostavlja da ima sposobnost transaktivacije transkripcije (171).

VP1 jedinstvena regija (VP1u) sadrži domenu fosfolipaze A2 (PLA2) između aminokiselina 11-66 (21). Među našim uzorcima primijećena je zamjena u aminokiselinskom slijedu 17 između Arg i Lys. Većina naših uzoraka ima arginin na ovoj poziciji, dok dva uzorka (HR199-17 i HR1289-20) imaju lizin. Fosfolipazna aktivnost ove domene je potrebna za endosomalni bijeg (172), ali budući da i Lys i Arg imaju pozitivno nabijene bočne lance, ne vjerujemo da bi to moglo utjecati na ove procese.

Među našim uzorcima primijećena je i promjena na mjestu 461 unutar varijabilne regije VR-VIIIB, za koju se navodi da je važna za kontakt s Fab regijom (173). Utjecaj ove zamjene nije ispitan. Međutim, VR-VIIIB je prethodno prepoznata kao potencijalna meta za razvoj peptidnog cjepiva koje bi široko neutraliziralo više sojeva HBoV-a (164). Ipak, daljnja istraživanja koja uključuju kultivaciju HBoV 1 na staničnim kulturama potrebna su kako bi se utvrdilo jesu li zamjene i varijabilna mjesta otkrivena u sekvenciranim sojevima imala utjecaj na produkciju virusa, infektivnost ili reaktivnost s neutralizirajućim anti-HBoV 1 protutijelima.

Izračunate evolucijske stope temeljene na nukleotidima su u skladu s prethodnim studijama koje su pokazale da se HBoV razvija brzinom od približno 10^{-4} do 10^{-5} zamjena po mjestu i godini (158). Najsporija evolucija zabilježena je u genu koji kodira NS1-70 protein, koji je također bio najkonzerviraniji na temelju analize razlika na nukleotidnoj razini. NP1 protein je imao bržu stopu evolucije, iako analiza aminokiselina pokazuje da je ovaj protein potpuno konzerviran među našim uzorcima, što ukazuje da sinonimne zamjene igraju glavnu ulogu u evoluciji tog gena. Studija Lu i sur. također pokazuje nešto veću stopu zamjena u NP1 genu u odnosu na NS1-70 (168).

Rekombinacija unutar genotipova čini se da igra značajnu ulogu u evoluciji bokavirusa (174). Upotrebom usporedbe organizacije genoma i filogenetske analize, pokazano je da se NS1 i NP1 sekvence HBoV 3 grupiraju s homolognim sekvencama soja HBoV 1, dok se VP1/VP2 sekvence HBoV 3 slične HBoV 2, pružajući dokaze da je HBoV 3 mogao nastati rekombinacijom između virusa HBoV 1 i HBoV 2 (4). Studija provedena u Tajlandu, koristeći analizu sekvenci u punoj duljini, otkrila je da je neobičan soj HBoV 4 rezultat rekombinacije između sojeva HBoV 2 i HBoV 4 (160). Osim toga, sekvenciranje cijelog genoma izolata HBoV iz Novosibirsk otkrilo je izolat koji je nastao rekombinacijom između HBoV 3 i HBoV 4 (175). Iako se HBoV-i smatraju raznolikim i često rekombinantnim patogenima, posebno HBoV 2-4 koji se uglavnom repliciraju u gastrointestinalnom traktu, rekombinacija nije otkrivena u uzorcima istraženim u ovom istraživanju.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja, možemo izvući sljedeće zaključke:

1. Učestalost HBoV u djece mlađe od 18 godina hospitalizirane zbog akutne respiratorne infekcije u sjeverozapadnoj Hrvatskoj praćene tijekom četiri godine iznosi 7,6 % te je u okvirima pojavnosti HBoV na globalnoj razini.
2. U odnosu na RSV i humani rinovirus, HBoV je detektiran u djece starije dobi, a vrhunac infekcije događa se tijekom druge godine djetetova života.
3. Pojavnost HBoV slijedi obrazac sezonstva karakterističan za druge respiratorne viruse, s vrhuncem od prosinca do veljače.
4. Uspoređujući kliničku prezentaciju oboljele djece s količinom virusa u uzorku, možemo zaključiti da djeca s većom koncentracijom virusa u sekretu nazofarinksa imaju težu kliničku sliku. U prilog tome navodimo sljedeće rezultate:
 - a. Količina virusa u sekretu nazofarinksa djece koja su razvila infekciju donjeg dišnog sustava značajno je veća od one u djece kod koje je infekcija lokalizirana u gornjim dišnim putevima.
 - b. Djeca koja su razvila respiratornu insuficijenciju te zbog toga trebala nadomjesno liječenje kisikom, imala su veću koncentraciju virusa u uzorcima u odnosu na djecu koja nisu trebala nadoknadu kisika u tijeku liječenja.
 - c. Djeca koja su primala empirijsku antibiotsku terapiju zbog teže kliničke slike imala su veću koncentraciju virusa u uzorku.
 - d. Djeca s predležecim bolestima imala su veću koncentraciju virusa u uzorku.
 - e. Kod djeteta kod kojeg je bilo potrebno liječenje u jedinici intenzivnog liječenja, koncentracija HBoV iznosila je $4,42 \times 10^6$ kopija/ml, a PCR-om nisu dokazani drugi mogući patogeni.
5. Analiza uzoraka u kojima je HBoV dokazan s drugim respiratornim virusom metodom kvantitativnog PCR-a i MT-PCR metodom pokazala je poklapanje rezultata ovih dviju metoda te bi se MT-PCR, koji nije klasična kvantitativna metoda, ali daje semikvantitativni izvještaj, mogao koristiti kao alternativna metoda određivanja količine HBoV. MT-PCR metoda omogućava usporedbu količine virusa kod višestrukih infekcija/kodetekcija te može pomoći pri određivanju pravog uzročnika infekcije.

6. Genotipizacijom prikupljenih sojeva dokazano je da svi sojevi pripadaju HBoV 1 genotipu. Analiza razlika u nukleotidima pokazuje ograničenu heterogenost između uzoraka, pri čemu su primijećene samo male razlike između različitih gena.
7. Humani bokavirus razvija se brzinom od približno 10^{-4} do 10^{-5} zamjena po mjestu i godini što odgovara uobičajenoj evolucijskoj stopi za DNA viruse.

U zaključku, ovim smo radom pokazali da diferencijalno-dijagnostički kod djece hospitalizirane zbog ARI treba uzeti u obzir HBoV kao jedan od mogućih uzročnika. Visoka koncentracija virusa u nazofaringealnom sekretu rizični je čimbenik za razvoj teže kliničke slike te bi bilo uputno mjeriti koncentraciju virusa. Količina virusa bi se mogla određivati kvantitativnim PCR-om ili metodom koja uspoređuje koncentraciju prema arbitrarnoj vrijednosti kao što je MT-PCR. Tako dobiveni podaci bi olakšali intepretaciju nalaza, odnosno procjenu kliničke značajnosti pozitivnog nalaza na HBoV.

8. SAŽETAK

Uvod i svrha rada: Cilj ovog istraživanja bio je istražiti epidemiološka i klinička obilježja akutnih respiratornih infekcija (ARI) u hospitalizirane djece kod koje je detektiran humani bokavirus (HBoV). Specifični ciljevi obuhvaćali su određivanje prevalencije HBoV, učestalost monodetekcije i kodetekcije s drugim respiratornim virusima, sezonsku pojavnost HBoV infekcije, kliničku prezentaciju i genotipizaciju izoliranih sojeva. Dalje, cilj je bio odrediti koncentraciju HBoV u nazofaringealnom sekretu oboljelih te ispitati postoji li povezanost između visoke koncentracije HBoV u uzorku i kliničke prezentacije i težine bolesti, potrebe za liječenjem nadoknadom kisika zbog razvoja respiratorne insuficijencije te duljine trajanja hospitalizacije u djece s dokazanim HBoV.

Materijali i metode: Istraživanje je provedeno u Klinici za dječje bolesti Zagreb i Općoj bolnici Karlovac u razdoblju od 2017. do 2021. godine. Ispitanici su bila djeca hospitalizirana zbog akutne respiratorne infekcije pretpostavljene virusne etiologije, kojima su uzeti uzorci obriska nazofarinksa i ždrijela. Učinjen je multipleks PCR na 15 respiratornih virusa, a za uzorke pozitivne na HBoV proveden je kvantitativni PCR. Za svakog ispitanika prikupljeni su demografski i klinički podaci. Uzorci u kojima je HBoV otkriven zajedno s drugim virusom dalje su istraženi primjenom MT-PCR-a te su rezultati MT-PCR-a uspoređeni s kvantitativnim PCR-om na HBoV. Genotipizacija izoliranih sojeva HBoV provedena je NGS metodom.

Rezultati: Od 957 testirane djece, HBoV je dokazan u 73 ispitanika te prevalencija ovog virusa u djece hospitalizirane zbog ARI iznosi 7,6 %. U preko 80 % slučajeva virus je dokazan u kombinaciji s drugim respiratornim virusom, najčešće s humanim rinovirusom. Virus je najčešće detektiran u djece od jedne do tri godine s vrhunem pojavnosti u zimskim mjesecima. Klinički se HBoV infekcija prezentirala kao infekcija gornjeg respiratornog sustava (IGDS) u 41,1 % djece, dok je 59,9 % djece s dokazanim HBoV razvilo infekciju donjeg dišnog sustava (IDDS). U slučajevima gdje je HBoV bio jedini dokazani patogen, koncentracije virusa su bile značajno više u nazofaringealnim sekretima djece koja su razvila IDDS u odnosu na djecu s IGDS ($p=0,016$). Djeca koja su liječena nadoknadom kisika su imala veću koncentraciju HBoV u uzorcima u odnosu na djecu koja nisu trebala kisik ($p=0,022$), kao i ona koja su primala empirijsku antimikrobnu terapiju ($p=0,049$) ili imali predliježeće bolesti ($p=0,017$). Nije jednoznačno dokazana povezanost duljine hospitalizacije s količinom HBoV. Usporedbom kvantitativnog PCR-a i MT-PCR metode pokazana je podudarnost rezultata ovih

dviju metoda, a Pearsonov koeficijent je iznosio 0,939. Genotipizacijom je dokazano da su svi sojevi pripadali HBoV 1 genotipu.

Zaključak: Učestalost HBoV u djece mlađe od 18 godina hospitalizirane zbog akutne respiratorne infekcije u okvirima je pojavnosti HBoV na globalnoj razini. U odnosu na RSV i humani rinovirus, HBoV inficira djecu starije dobi, a vrhunac pojavnosti ovog virusa pada u drugu godinu djetetova života. Pojavnost HBoV slijedi obrazac sezonstva karakterističan i za druge respiratorne viruse, s vrhuncem od studenog do ožujka. Djeca s većom koncentracijom virusa u nazofaringealnim sekretima češće imaju težu kliničku sliku. Usporedbom kvantitativnog PCR-a i MT-PCR metode, pokazali smo da se MT-PCR metoda može koristiti kao alternativa klasičnom kvantitativnom PCR-u za određivanje količine HBoV.

9. SUMMARY

Epidemiological and clinical characteristics of acute respiratory infections in hospitalized children positive for human bocavirus

Maja Mijač, 2024.

Introduction and aim: The goal of this research was to investigate the epidemiological and clinical characteristics of acute respiratory infection (ARI) in hospitalized children with proven HBoV and to compare concentration of HBoV with clinical presentation of infection.

Material and methods: The research was conducted among children hospitalized for ARI in two institutions in northwest Croatia over a four-year period. Samples were analysed using multiplex PCR for 15 respiratory viruses, quantitative PCR for HBoV and MT-PCR. Clinical and demographic data were collected. The genotyping of isolated strains was performed using the NGS method.

Results: The prevalence of HBoV was 7,6%. In cases of monodetection, HBoV was significantly more frequently present in high concentration in children with LRTI compared to children with URTI ($p=0,016$). Children receiving oxygen supplementation had a higher HBoV concentration in the sample ($p=0,022$), as well as children receiving empirical antibiotic therapy ($p=0,01$) and children with underlying diseases ($p=0,017$), respectively.

Conclusion: High concentration of HBoV was linked to more severe presentation of infection. MT-PCR method can be used as an alternative to classical quantitative PCR for HBoV.

10. LITERATURA

1. 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;102:12891-12896.
2. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*, 2012;22:46-64.
3. Manteufel J, Truyen U. Animal bocaviruses: a brief review. *Intervirology*. 2008;51(5):328-34. doi: 10.1159/000173734.
4. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M i sur. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2016;22(39):8684-8697. doi: 10.3748/wjg.v22.i39.8684.
5. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000391. doi: 10.1371/journal.ppat.1000391.
6. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):43-113.
7. Kilham L, Olivier Lj. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology*. 1959;7(4):428-37. doi: 10.1016/0042-6822(59)90071-6.
8. Anderson MJ. Human parvovirus infections. *J Virol Methods*. 1987;17(1-2):175-81. doi: 10.1016/0166-0934(87)90080-2.
9. Chorba T, Coccia P, Holman RC, Tattersall P, Anderson LJ, Sudman J i sur. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis*. 1986;154(3):383-93. doi: 10.1093/infdis/154.3.383.
10. Thurn J. Human parvovirus B19: historical and clinical review. *Rev Infect Dis*. 1988;10(5):1005-11. doi: 10.1093/clinids/10.5.1005.
11. Berns KI, Parrish CR. *Parvoviridae*. U: Knipe DM, Howley PM ur. *Fields Virology*. 6.izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. Str. 1769-91.
12. Péntzes JJ, Söderlund-Venermo M, Canuti M, Eis-Hübinger AM, Hughes J, Cotmore SF i sur. Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch Virol*. 2020;165(9):2133-2146. doi: 10.1007/s00705-020-04632-4.
13. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358-378. doi: 10.1038/s41573-019-0012-9.
14. Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*. 2005;79(13):8230-6. doi: 10.1128/JVI.79.13.8230-8236.2005.
15. Väisänen E, Fu Y, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Human Protoparvoviruses. *Viruses*. 2017;9(11):354. doi: 10.3390/v9110354.
16. National Center for Biotechnology Information. PubChem Taxonomy Summary for Taxonomy 1511871, Primate bocaparvovirus 1. 2023. [pristupljeno 27.03.2023.]. Dostupno na <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Primate-bocaparvovirus-1>.
17. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hübinger AM, Hughes J i sur. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol*. 2019;100(3):367-368. doi: 10.1099/jgv.0.001212.
18. Söderlund-Venermo M. Emerging Human Parvoviruses: The Rocky Road to Fame. *Annu Rev Virol*. 2019;6(1):71-91. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015803.

19. Yan Z, Deng X, Qiu J. Human Bocavirus 1 Infection of Well-Differentiated Human Airway Epithelium. *Curr Protoc Microbiol.* 2020;58(1):e107. doi: 10.1002/cpmc.107.
20. Gurda BL, Parent KN, Bladek H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C i sur. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol.* 2010;84(12):5880-9. doi: 10.1128/JVI.02719-09.
21. Qu XW, Liu WP, Qi ZY, Duan ZJ, Zheng LS, Kuang ZZ i sur. Phospholipase A2-like activity of human bocavirus VP1 unique region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;365(1):158-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.164.
22. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W i sur. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002899. doi: 10.1371/journal.ppat.1002899.
23. Shao L, Shen W, Wang S, Qiu J. Recent Advances in Molecular Biology of Human Bocavirus 1 and Its Applications. *Front Microbiol.* 2021;12:696604. doi: 10.3389/fmicb.2021.696604.
24. Ponnazhagan S, Weigel KA, Raikwar SP, Mukherjee P, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes. *J Virol.* 1998;72(6):5224-30. doi: 10.1128/JVI.72.6.5224-5230.1998.
25. Chen AY, Cheng F, Lou S, Luo Y, Liu Z, Delwart E i sur. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology.*; 403(2):145-54. doi: 10.1016/j.virol.2010.04.014.
26. Zhang J, Bai Y, Zhu B, Hao S, Chen Z, Wang H i sur. Mutations in the C-terminus of HBoV NS1 affect the function of NP1. *Sci Rep.* 2017;7(1):7407. doi: 10.1038/s41598-017-06513-4.
27. Shen W, Deng X, Zou W, Cheng F, Engelhardt JF, Yan Z i sur. Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1. *J Virol.* 2015;89(19):10097-109. doi: 10.1128/JVI.01374-15.
28. Dong Y, Fasina OO, Pintel DJ. The Human Bocavirus 1 NP1 Protein Is a Multifunctional Regulator of Viral RNA Processing. *J Virol.* 2018;92(22):e01187-18. doi: 10.1128/JVI.01187-18.
29. Zou W, Cheng F, Shen W, Engelhardt JF, Yan Z, Qiu J. Nonstructural Protein NP1 of Human Bocavirus 1 Plays a Critical Role in the Expression of Viral Capsid Proteins. *J Virol.* 2016;90(9):4658-4669. doi: 10.1128/JVI.02964-15.
30. Wang Z, Shen W, Cheng F, Deng X, Engelhardt JF, Yan Z i sur. Parvovirus Expresses a Small Noncoding RNA That Plays an Essential Role in Virus Replication. *J Virol.* 2017;91(8):e02375-16. doi: 10.1128/JVI.02375-16.
31. Adeyemi RO, Landry S, Davis ME, Weitzman MD, Pintel DJ. Parvovirus minute virus of mice induces a DNA damage response that facilitates viral replication. *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001141. doi: 10.1371/journal.ppat.1001141.
32. Wang Z, Deng X, Zou W, Engelhardt JF, Yan Z, Qiu J. Human Bocavirus 1 Is a Novel Helper for Adeno-associated Virus Replication. *J Virol.* 2017;91(18):e00710-17. doi: 10.1128/JVI.00710-17.
33. Schwartz RA, Carson CT, Schubert C, Weitzman MD. Adeno-associated virus replication induces a DNA damage response coordinated by DNA-dependent protein kinase. *J Virol.* 2009;83(12):6269-78. doi: 10.1128/JVI.00318-09.
34. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 2000;74(6):2777-85. doi: 10.1128/jvi.74.6.2777-2785.2000.

35. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol.* 2000;74(19):9184-96. doi: 10.1128/jvi.74.19.9184-9196.2000.
36. Cotmore SF, Tattersall P. Parvovirus diversity and DNA damage responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a012989. doi: 10.1101/cshperspect.a012989.
37. Deng X, Yan Z, Cheng F, Engelhardt JF, Qiu J. Replication of an Autonomous Human Parvovirus in Non-dividing Human Airway Epithelium Is Facilitated through the DNA Damage and Repair Pathways. *PLoS Pathog.* 2016;12(1):e1005399. doi: 10.1371/journal.ppat.1005399.
38. Deng X, Xu P, Zou W, Shen W, Peng J, Liu K i sur. DNA Damage Signaling Is Required for Replication of Human Bocavirus 1 DNA in Dividing HEK293 Cells. *J Virol.* 2016;91(1):e01831-16. doi: 10.1128/JVI.01831-16.
39. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):517-37. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085444.
40. Weitzman MD, Fradet-Turcotte A. Virus DNA Replication and the Host DNA Damage Response. *Annu Rev Virol.* 2018;5(1):141-164. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043534.
41. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol.* 2009;83(15):7739-48. doi: 10.1128/JVI.00614-09.
42. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *J Virol Methods.* 2014;195:112-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.012.
43. Deng X, Yan Z, Luo Y, Xu J, Cheng F, Li Y i sur. In vitro modeling of human bocavirus 1 infection of polarized primary human airway epithelia. *J Virol.* 2013;87(7):4097-102. doi: 10.1128/JVI.03132-12.
44. Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, Rognlien AG, Døllner H. Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2010;49(3):158-62. doi: 10.1016/j.jcv.2010.07.016.
45. Khalfaoui S, Eichhorn V, Karagiannidis C, Bayh I, Brockmann M, Pieper M i sur. Lung Infection by Human Bocavirus Induces the Release of Profibrotic Mediator Cytokines In Vivo and In Vitro. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147010. doi: 10.1371/journal.pone.0147010.
46. Alkubaisi NA, Aziz IM, Alsaleh AN, Alhethel AF, Almajhdi FN. Molecular Profiling of Inflammatory Mediators in Human Respiratory Syncytial Virus and Human Bocavirus Infection. *Genes (Basel).* 2023;14(5):1101. doi: 10.3390/genes14051101.
47. Chen AY, Qiu J. Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest. *Future Virol.* 2010;5(6):731-743. doi: 10.2217/fvl.10.56.
48. Abdel-Latif L, Murray BK, Renberg RL, O'Neill KL, Porter H, Jensen JB i sur. Cell death in bovine parvovirus-infected embryonic bovine tracheal cells is mediated by necrosis rather than apoptosis. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 9):2539-2548. doi: 10.1099/vir.0.81915-0.
49. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3328. doi: 10.3390/ijms20133328.

50. Deng X, Zou W, Xiong M, Wang Z, Engelhardt JF, Ye SQ i sur. Human Parvovirus Infection of Human Airway Epithelia Induces Pyroptotic Cell Death by Inhibiting Apoptosis. *J Virol*. 2017;91(24):e01533-17. doi: 10.1128/JVI.01533-17.
51. Chung JY, Han TH, Kim JS, Kim SW, Park CG, Hwang ES. Th1 and Th2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis. *J Clin Virol*. 2008;43(2):223-5. doi: 10.1016/j.jcv.2008.06.008.
52. Tu M, Liu F, Chen S, Wang M, Cheng A. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virol J*. 2015;12:114. doi: 10.1186/s12985-015-0344-y.
53. Deng ZH, Hao YX, Yao LH, Xie ZP, Gao HC, Xie LY i sur. Immunogenicity of recombinant human bocavirus-1,2 VP2 gene virus-like particles in mice. *Immunology*. 2014;142(1):58-66. doi: 10.1111/imm.12202.
54. Zhang Z, Zheng Z, Luo H, Meng J, Li H, Li Q i sur. Human bocavirus NP1 inhibits IFN- β production by blocking association of IFN regulatory factor 3 with IFNB promoter. *J Immunol*. 2012;189(3):1144-53. doi: 10.4049/jimmunol.1200096.
55. Luo H, Zhang Z, Zheng Z, Ke X, Zhang X, Li Q i sur. Human bocavirus VP2 upregulates IFN- β pathway by inhibiting ring finger protein 125-mediated ubiquitination of retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*. 2013;191(2):660-9. doi: 10.4049/jimmunol.1202933.
56. Bhat R, Almajhdi FN. Induction of Immune Responses and Immune Evasion by Human Bocavirus. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(8):728-735. doi: 10.1159/000514688.
57. Lindner J, Zehentmeier S, Franssila R, Barabas S, Schroeder J, Deml L i sur. CD4+ T helper cell responses against human bocavirus viral protein 2 viruslike particles in healthy adults. *J Infect Dis*. 2008;198(11):1677-84. doi: 10.1086/592985.
58. Kumar A, Filippone C, Lahtinen A, Hedman L, Söderlund-Venermo M, Hedman K i sur. Comparison of Th-cell immunity against human bocavirus and parvovirus B19: proliferation and cytokine responses are similar in magnitude but more closely interrelated with human bocavirus. *Scand J Immunol*. 2011;73(2):135-40. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02483.x.
59. Wagner JC, Pyles RB, Miller AL, Nokso-Koivisto J, Loeffelholz MJ, Chonmaitree T. Determining Persistence of Bocavirus DNA in the Respiratory Tract of Children by Pyrosequencing. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(5):471-6. doi:10.1097/INF.0000000000001058.
60. Proenca-Modena JL, Pereira Valera FC, Jacob MG, Buzatto GP, Saturno TH, Lopes L i sur. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e42136. doi: 10.1371/journal.pone.0042136.
61. Proenca-Modena JL, Paula FE, Buzatto GP, Carenzi LR, Saturno TH, Prates MC i sur. Hypertrophic adenoid is a major infection site of human bocavirus 1. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):3030-7. doi: 10.1128/JCM.00870-14.
62. Polo D, Lema A, Gándara E, Romalde JL. Prevalence of human bocavirus infections in Europe. A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(5):2451-2461. doi: 10.1111/tbed.14233.
63. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivković-Jureković I, Čepin-Bogović J, Gagro A, Vraneš J. Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. *J Pathog*. 2016;2016:2168780. doi: 10.1155/2016/2168780.
64. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Ivković-Jureković I, Tešović G, Mlinarić-Galinović G, Lukšić I i sur. High Detection Rates of Human Bocavirus in Infants and Small

- Children with Lower Respiratory Tract Infection from Croatia. *Clin Lab*. 2019;65(1). doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.180702.
65. Mijač M, Ljubin-Sternak S, Ivković-Jureković I, Tot T, Lukić-Grlić A, Kale I i sur. Human Bocavirus in Nasopharyngeal Secretion of Hospitalized Children with Acute Respiratory Tract Infection-First Year Results of a Four-Year Prospective Study. *Croatian Journal of Infection/Infektoloski Glasnik*. 2018;38(4).
 66. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A i sur. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1625-32. doi: 10.1086/652405.
 67. Li H, He M, Zeng P, Gao Z, Bian G, Yang C i sur. The genomic and seroprevalence of human bocavirus in healthy Chinese plasma donors and plasma derivatives. *Transfusion*. 2015;55(1):154-63. doi: 10.1111/trf.12785.
 68. 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(10):897-902. doi: 10.1097/INF.0b013e3181757b16.
 69. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T i sur. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J Infect Dis*. 2011;204(9):1403-12. doi: 10.1093/infdis/jir525.
 70. Cecchini S, Negrete A, Virag T, Graham BS, Cohen JI, Kotin RM. Evidence of prior exposure to human bocavirus as determined by a retrospective serological study of 404 serum samples from adults in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(5):597-604. doi: 10.1128/CVI.00470-08.
 71. Hustedt JW, Christie C, Hustedt MM, Esposito D, Vazquez M. Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica. *PLoS One*. 2012;7(5):e38206. doi: 10.1371/journal.pone.0038206.
 72. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C i sur. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. 2019;3(6):418-426. doi: 10.1016/S2352-4642(19)30057-4.
 73. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(5):848-50. doi: 10.3201/eid1205.051424.
 74. Durigon GS, Oliveira DB, Vollet SB, Storni JG, Felício MC, Finelli C i sur. Hospital-acquired human bocavirus in infants. *J Hosp Infect*. 2010;76(2):171-3. doi: 10.1016/j.jhin.2010.04.028.
 75. Nokso-Koivisto J, Pyles RB, Miller AL, Jennings K, Loeffelholz M, Chonmaitree T. Role of Human Bocavirus in Upper Respiratory Tract Infections and Acute Otitis Media. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3(2):98-103. doi: 10.1093/jpids/pit061.
 76. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C i sur. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol*. 2008;80(4):716-23. doi: 10.1002/jmv.21108.
 77. Peltola V, Söderlund-Venermo M, Jartti T. Human bocavirus infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(2):178-9. doi: 10.1097/INF.0b013e31827fef67.
 78. 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. doi: 10.1086/505399.
 79. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Billal DS i sur. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr*. 2009;168(11):1365-72. doi: 10.1007/s00431-009-0939-7.

80. Rezes S, Söderlund-Venermo M, Roivainen M, Kemppainen K, Szabó Z, Sziklai I i sur. Human bocavirus and rhino-enteroviruses in childhood otitis media with effusion. *J Clin Virol.* 2009;46(3):234-7. doi: 10.1016/j.jcv.2009.08.010.
81. Völz S, Schildgen O, Klinkenberg D, Ditt V, Müller A, Tillmann RL i sur. Prospective study of Human Bocavirus (HBoV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *J Clin Virol.* 2007;40(3):229-35. doi: 10.1016/j.jcv.2007.07.017.
82. Brieu N, Guyon G, Rodière M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:969-973.
83. Chow BD, Huang YT, Esper FP. Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio. *J Clin Virol.* 2008;43(3):302-306.
84. Del Rosal T, García-García ML, Calvo C, Gozalo F, Pozo F, Casas I. Recurrent wheezing and asthma after bocavirus bronchiolitis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2016;44:410-414.
85. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF i sur. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.* 2007;195(7):1038-45. doi: 10.1086/512163.
86. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R i sur. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):904-10. doi: 10.1086/512196.
87. Rhedin S, Lindstrand A, Hjelmgren A, Ryd-Rinder M, Öhrmalm L, Tolfvenstam T i sur. Respiratory viruses associated with community-acquired pneumonia in children: matched case-control study. *Thorax.* 2015;70(9):847-53. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206933.
88. Lukkarinen H, Söderlund-Venermo M, Vuorinen T, Allander T, Hedman K, Simell O i sur. Human bocavirus 1 may suppress rhinovirus-associated immune response in wheezing children. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(1):256-8.e1-4. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.014.
89. Zheng XY, Xu YJ, Guan WJ, Lin LF. Regional, age and respiratory-secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: a literature review. *Arch Virol.* 2018;163(4):845-853. doi: 10.1007/s00705-017-3700-y.
90. Flight W, Jones A. The diagnosis and management of respiratory viral infections in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med.* 2017;11(3):221-227. doi: 10.1080/17476348.2017.1288102.
91. Körner RW, Söderlund-Venermo M, van Koningsbruggen-Rietschel S, Kaiser R, Malecki M, Schildgen O. Severe human bocavirus infection, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2303-5. doi: 10.3201/eid1712.110574.
92. Edner N, Castillo-Rodas P, Falk L, Hedman K, Söderlund-Venermo M, Allander T. Life-threatening respiratory tract disease with human bocavirus-1 infection in a 4-year-old child. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):531-2. doi: 10.1128/JCM.05706-11.
93. Uršič T, Steyer A, Kopriva S, Kalan G, Krivec U, Petrovec M. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1179-81. doi: 10.1128/JCM.02362-10.
94. Mori D, Ranawaka U, Yamada K, Rajindrajith S, Miya K, Perera HK i sur. Human bocavirus in patients with encephalitis, Sri Lanka, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(11):1859-62. doi: 10.3201/eid1911.121548.

95. Tabatabai J, Fakhiri J, Meyburg J, Linse KP, Xu M, Söderlund-Venermo M i sur. Severe Human Bocavirus 1 Respiratory Tract Infection in an Immunodeficient Child With Fatal Outcome. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(9):e219-e222. doi: 10.1097/INF.0000000000002354.
96. Uršič T, Jevšnik M, Zigon N, Krivec U, Beden AB, Praprotnik M i sur. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol*. 2012;84(1):99-108. doi: 10.1002/jmv.22217.
97. Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carballo D, Martínez-Monteserín E, Casas I. Infections and coinfections by respiratory human bocavirus during eight seasons in hospitalized children. *J Med Virol*. 2016;88(12):2052-2058. doi: 10.1002/jmv.24562.
98. Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X i sur. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3218-23. doi: 10.1128/JCM.02140-06.
99. Jartti T, Kuusipalo H, Vuorinen T, Söderlund-Venermo M, Allander T, Waris M i sur. Allergic sensitization is associated with rhinovirus-, but not other virus-, induced wheezing in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(7):1008-14. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01059.x.
100. Lee HN, Koo HJ, Kim SH, Choi SH, Sung H, Do KH. Human Bocavirus Infection in Adults: Clinical Features and Radiological Findings. *Korean J Radiol*. 2019;20(7):1226-1235. doi: 10.3348/kjr.2018.0634.
101. Ishiguro T, Hirota S, Kobayashi Y, Takano K, Kobayashi Y, Shimizu Y i sur. Fatal Primary Human Bocavirus Pneumonia in an Immunocompetent Adult. *Intern Med*. 2020;59(3):421-424. doi: 10.2169/internalmedicine.3583-19.
102. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramírez ML i sur. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(11):1756-8. doi: 10.3201/eid1311.070671.
103. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW i sur. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2116-22. doi: 10.1128/JCM.00027-07.
104. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM i sur. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3231-5. doi: 10.1128/JCM.00889-06.
105. Jiang W, Yin F, Zhou W, Yan Y, Ji W. Clinical significance of different virus load of human bocavirus in patients with lower respiratory tract infection. *Sci Rep*. 2016;6:20246. doi: 10.1038/srep20246.
106. Korppi M. Polymerase chain reaction in respiratory samples alone is not a reliable marker of bocavirus infection. *Pediatr Pulmonol*. 2014;49(5):515-6. doi: 10.1002/ppul.22939.
107. Tong R, Shen L, Yin W, Zhou W, Lu J, Zheng M i sur. Prevalence of human parvovirus B19, bocavirus, and PARV4 in blood samples from the general population of China and lack of a correlation between parvovirus and hepatitis B co-infection. *PLoS One*. 2013;8(5):e64391. doi: 10.1371/journal.pone.0064391.
108. Bruning AH, Susi P, Toivola H, Christensen A, Söderlund-Venermo M, Hedman K i sur. Detection and monitoring of human bocavirus 1 infection by a new rapid antigen test. *New Microbes New Infect*. 2016;11:17-9. doi: 10.1016/j.nmni.2016.01.015.
109. Kantola K, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Partanen J i sur. B-Cell Responses to Human Bocaviruses 1-4: New Insights from a Childhood Follow-Up Study. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139096. doi: 10.1371/journal.pone.0139096.

110. Ademhan Tural D, Yalcin E, Emiralioglu N, Ozsezen B, Alp A, Sunman B i sur. Human bocavirus and human metapneumovirus in children with lower respiratory tract infections: Effects on clinical, microbiological features and disease severity . *Pediatr Int.* 2022;64(1):e15102. doi: 10.1111/ped.15102.
111. Alkhalf H, Almutairi AR, Almutairi A, Almutairi RK, AlGhnam S, Aljohani S i sur. Prevalence and Clinical Characterization of Bocavirus Infection in a Specialized Children's Hospital in Saudi Arabia. *Cureus.* 2022;14(2):e22127. doi: 10.7759/cureus.22127.
112. Jartti T, Söderlund-Venermo M, Allander T, Vuorinen T, Hedman K, Ruuskanen O. No efficacy of prednisolone in acute wheezing associated with human bocavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(6):521-3. doi: 10.1097/INF.0b013e318216dd81.
113. Bagasi AA, Howson-Wells HC, Clark G, Tarr AW, Soo S, Irving WL i sur. Human Bocavirus infection and respiratory tract disease identified in a UK patient cohort. *J Clin Virol.* 2020;129:104453. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104453.
114. American Academy of Pediatrics. *Bocavirus. U: Red Book: 2021-2024 Report of the Committee on Infectious Disease.* 32.izd. Itasca, IL; 2021. Str. 233-235.
115. Koskenvuo M, Möttönen M, Waris M, Allander T, Salmi TT, Ruuskanen O. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr.* 2008;167(9):1011-5. doi: 10.1007/s00431-007-0631-8.
116. Mijač M, Ljubin-Sternak S, Ivković-Jureković I, Vraneš J. Comparison of MT-PCR with Quantitative PCR for Human Bocavirus in Respiratory Samples with Multiple Respiratory Viruses Detection. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(5):846. doi: 10.3390/diagnostics13050846.
117. Ljubin-Sternak S, Slović A, Mijač M, Jurković M, Forčić D, Ivković-Jureković i sur. Prevalence and Molecular Characterization of Human Bocavirus Detected in Croatian Children with Respiratory Infection. *Viruses.* 2021;13(9):1728. doi: 10.3390/v13091728.
118. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357-9. doi: 10.1038/nmeth.1923.
119. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N i sur. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
120. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008;18(5):821-9. doi: 10.1101/gr.074492.107.
121. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772-80. doi: 10.1093/molbev/mst010.
122. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014;30(22):3276-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.
123. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197.
124. Darrriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
125. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29(8):1969-73. doi: 10.1093/molbev/mss075.

126. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE; WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365(9465):1147-52. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71877-8.
127. Sarna M, Ware RS, Lambert SB, Sloots TP, Nissen MD, Grimwood K. Timing of First Respiratory Virus Detections in Infants: A Community-Based Birth Cohort Study. *J Infect Dis*. 2018;217(3):418-427. doi: 10.1093/infdis/jix599.
128. Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. *J Infect Dis*. 2015;212(4):516-24. doi: 10.1093/infdis/jiv044.
129. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*. 1986;140(6):543-6. doi: 10.1001/archpedi.1986.02140200053026.
130. Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, D'Abramo A Jr, Cosby C, Weibel C i sur. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Dis*. 2008;198(1):41-50. doi: 10.1086/588674.
131. Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Simell S i sur. Association of human bocavirus 1 infection with respiratory disease in childhood follow-up study, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):264-71. doi: 10.3201/eid1802.111293.
132. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C i sur. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N Engl J Med*. 2015;372(9):835-45. doi: 10.1056/NEJMoa1405870.
133. Kengne-Nde C, Kenmoe S, Modiyinji AF, Njouom R. Prevalence of respiratory viruses using polymerase chain reaction in children with wheezing, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243735. doi: 10.1371/journal.pone.0243735.
134. Ghietto LM, Majul D, Ferreyra Soaje P, Baumeister E, Avaro M, Insfrán C i sur. Comorbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection. *Arch Virol*. 2015;160(1):117-27. doi:10.1007/s00705-014-2238-5.
135. Sun J, Li Y. Pyroptosis and respiratory diseases: A review of current knowledge. *Front Immunol*. 2022;13:920464. doi: 10.3389/fimmu.2022.920464.
136. Dangor Z, Verwey C, Lala SG, Mabaso T, Mopeli K, Parris D i sur. Lower Respiratory Tract Infection in Children: When Are Further Investigations Warranted? *Front Pediatr*. 2021;9:708100. doi: 10.3389/fped.2021.708100.
137. Li X, Kantola K, Hedman L, Arku B, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Original antigenic sin with human bocaviruses 1-4. *J Gen Virol*. 2015;96(10):3099-3108. doi: 10.1099/jgv.0.000253.
138. Christensen A, Døllner H, Skanke LH, Krokstad S, Moe N, Nordbø SA. Detection of spliced mRNA from human bocavirus 1 in clinical samples from children with respiratory tract infections. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(4):574-80. doi: 10.3201/eid1904.121775.
139. Xu M, Arku B, Jartti T, Koskinen J, Peltola V, Hedman K i sur. Comparative Diagnosis of Human Bocavirus 1 Respiratory Infection With Messenger RNA Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA Quantitative PCR, and Serology. *J Infect Dis*. 2017;215(10):1551-1557. doi: 10.1093/infdis/jix169.
140. Dudognon D, Levy C, Chalumeau M, Biscardi S, Dommergues MA, Dubos F i sur. Pneumonia Study Group. Diagnostic Accuracy of Routinely Available Biomarkers to Predict Bacteremia in Children With Community-Acquired Pneumonia: A

- Secondary Analysis of the GPIP/ACTIV Pneumonia Study in France, 2009-2018. *Front Pediatr.* 2021;9:684628. doi: 10.3389/fped.2021.684628.
141. Haran JP, Beaudoin FL, Suner S, Lu S. C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. *Am J Emerg Med.* 2013;31(1):137-44. doi: 10.1016/j.ajem.2012.06.026.
 142. Moesker FM, van Kampen JJ, van der Eijk AA, van Rossum AM, de Hoog M, Schutten M i sur. Human bocavirus infection as a cause of severe acute respiratory tract infection in children. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(10):964.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.06.014.
 143. Akademija Medicinskih Znanosti Hrvatske. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021.g. Tambić Andrašević A, Tambić T, ur. [Internet] Zagreb: Akademija Medicinskih Znanosti Hrvatske; 2021 [pristupljeno 19.07.2023.] Dostupno na <https://iskra.bfm.hr/wp-content/uploads/2022/11/Knjiga-2021-za-web-final.pdf>
 144. Wang W, Guan R, Liu Z, Zhang F, Sun R, Liu S i sur. Epidemiologic and clinical characteristics of human bocavirus infection in children hospitalized for acute respiratory tract infection in Qingdao, China. *Front Microbiol.* 2022;13:935688. doi: 10.3389/fmicb.2022.935688.
 145. Madhi SA, Klugman KP; Vaccine Trialist Group. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med.* 2004;10(8):811-3. doi: 10.1038/nm1077.
 146. Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, Moll HA, Verbrugh HA, Jaddoe VW *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1840-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03480.x.
 147. Nguyen DT, de Witte L, Ludlow M, Yüksel S, Wiesmüller KH, Geijtenbeek TB i sur. The synthetic bacterial lipopeptide Pam3CSK4 modulates respiratory syncytial virus infection independent of TLR activation. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001049. doi: 10.1371/journal.ppat.1001049.
 148. van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW, de Steenhuijsen Piters WA, Bosch AA, van Gils EJ i sur. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS One.* 2012;7(10):e47711. doi: 10.1371/journal.pone.0047711.
 149. Mattila S, Paalanne N, Honkila M, Pokka T, Tapiainen T. Effect of Point-of-Care Testing for Respiratory Pathogens on Antibiotic Use in Children: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 2022;5(6):e2216162. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.16162.
 150. Semret M, Schiller I, Jardin BA, Frenette C, Loo VG, Papenburg J i sur. Multiplex Respiratory Virus Testing for Antimicrobial Stewardship: A Prospective Assessment of Antimicrobial Use and Clinical Outcomes Among Hospitalized Adults. *J Infect Dis.* 2017;216(8):936-944. doi: 10.1093/infdis/jix288.
 151. Keske Ş, Ergönül Ö, Tutucu F, Karaaslan D, Palaoglu E, Can F. The rapid diagnosis of viral respiratory tract infections and its impact on antimicrobial stewardship programs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(4):779-783. doi: 10.1007/s10096-017-3174-6.
 152. Langley R, Cunningham S. How Should Oxygen Supplementation Be Guided by Pulse Oximetry in Children: Do We Know the Level? *Front Pediatr.* 2017;4:138. doi: 10.3389/fped.2016.00138.
 153. Roberts AL, Sammons JS, Mourani PM, Thomas NJ, Yehya N. Specific Viral Etiologies Are Associated With Outcomes in Pediatric Acute Respiratory Distress

- Syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 2019;20(9):e441-e446. doi: 10.1097/PCC.0000000000002008.
154. Ghazaly MMH, Abu Faddan NH, Raafat DM, Mohammed NA, Nadel S. Acute viral bronchiolitis as a cause of pediatric acute respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr*. 2021;180(4):1229-1234. doi: 10.1007/s00431-020-03852-9.
 155. Zhou L, Zheng S, Xiao Q, Ren L, Xie X, Luo J i sur. Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infect Dis*. 2014;14:424. doi: 10.1186/1471-2334-14-424.
 156. Edner N, Castillo-Rodas P, Falk L, Hedman K, Söderlund-Venermo M, Allander T. Life-threatening respiratory tract disease with human bocavirus-1 infection in a 4-year-old child. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):531-2. doi: 10.1128/JCM.05706-11.
 157. Wollny K, Pitt T, Brenner D, Metcalfe A. Predicting prolonged length of stay in hospitalized children with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res*. 2022;92(6):1780-1786. doi: 10.1038/s41390-022-02008-9.
 158. Szewczuk E, Thapa K, Anninos T, McPhie K, Higgins G, Dwyer DE i sur. Rapid semi-automated quantitative multiplex tandem PCR (MT-PCR) assays for the differential diagnosis of influenza-like illness. *BMC Infect Dis*. 2010;10:113. doi: 10.1186/1471-2334-10-113.
 159. Esper FP, Spahlinger T, Zhou L. Rate and influence of respiratory virus co-infection on pandemic (H1N1) influenza disease. *J Infect*. 2011;63(4):260-6. doi: 10.1016/j.jinf.2011.04.004.
 160. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: a systematic review. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15(4):363-70. doi: 10.1016/j.prrv.2013.11.001.
 161. Mazur NI, Bont L, Cohen AL, Cohen C, von Gottberg A, Groome MJ i sur. Severity of Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Infection With Viral Coinfection in HIV-Uninfected Children. *Clin Infect Dis*. 2017;64(4):443-450. doi: 10.1093/cid/ciw756.
 162. Deng Y, Gu X, Zhao X, Luo J, Luo Z, Wang L i sur. High viral load of human bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection. *PLoS One*. 2012;7(3):e34353. doi: 10.1371/journal.pone.0034353.
 163. Zhao B, Yu X, Wang C, Teng Z, Wang C, Shen J i sur. High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. *PLoS One*. 2013;8(4):e62318. doi: 10.1371/journal.pone.0062318.
 164. Jiang W, Yin F, Zhou W, Yan Y, Ji W. Clinical significance of different virus load of human bocavirus in patients with lower respiratory tract infection. *Sci Rep*. 2016;6:20246. doi: 10.1038/srep20246.
 165. Feikin DR, Fu W, Park DE, Shi Q, Higdon MM, Baggett HC i sur. Is Higher Viral Load in the Upper Respiratory Tract Associated With Severe Pneumonia? Findings From the PERCH Study. *Clin Infect Dis*. 2017;64(suppl_3):S337-S346. doi: 10.1093/cid/cix148.
 166. Kenmoe S, Vernet MA, Njankouo-Ripa M, Penlap VB, Vabret A, Njouom R. Phylogenic analysis of human bocavirus detected in children with acute respiratory infection in Yaounde, Cameroon. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):293. doi: 10.1186/s13104-017-2620-y.
 167. Madi NM, Al-Adwani A. Human bocavirus (HBoV) in Kuwait: molecular epidemiology and clinical outcome of the virus among patients with respiratory diseases. *J Med Microbiol*. 2020;69(7):1005-1012. doi: 10.1099/jmm.0.001219.

168. Koseki N, Teramoto S, Kaiho M, Gomi-Endo R, Yoshioka M, Takahashi Y i sur. Detection of human bocaviruses 1 to 4 from nasopharyngeal swab samples collected from patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2118-21. doi: 10.1128/JCM.00098-12.
169. Lu QB, Wo Y, Wang HY, Huang DD, Zhao J, Zhang XA i sur. Epidemic and molecular evolution of human bocavirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(1):75-81. doi: 10.1007/s10096-014-2215-7.
170. Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Complete genome sequence analysis of novel human bocavirus reveals genetic recombination between human bocavirus 2 and human bocavirus 4. *Infect Genet Evol.* 2013;17:132-6. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.040.
171. Shao L, Shen W, Wang S, Qiu J. Recent Advances in Molecular Biology of Human Bocavirus 1 and Its Applications. *Front Microbiol.* 2021;12:696604. doi: 10.3389/fmicb.2021.696604.
172. Girod A, Wobus CE, Zádori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P i sur. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 5):973-978. doi: 10.1099/0022-1317-83-5-973.
173. Kailasan S, Garrison J, Ilyas M, Chipman P, McKenna R, Kantola K i sur. Mapping Antigenic Epitopes on the Human Bocavirus Capsid. *J Virol.* 2016;90(9):4670-4680. doi: 10.1128/JVI.02998-15.
174. Zhao M, Zhu R, Qian Y, Deng J, Wang F, Sun Y i sur. Prevalence analysis of different human bocavirus genotypes in pediatric patients revealed intra-genotype recombination. *Infect Genet Evol.* 2014;27:382-8. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.022.
175. Tyumentsev AI, Tikunova NV, Tikunov AY, Babkin IV. Recombination in the evolution of human bocavirus. *Infect Genet Evol.* 2014;28:11-4. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.026.

11. ŽIVOTOPIS

Maja Mijač rođena je 25. siječnja 1984. godine u Sinju, gdje je završila Osnovnu školu fra Pavla Vučkovića i Opću gimnaziju Dinka Šimunovića. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu je upisala 2002., a diplomirala 2008. godine. Pripravnički staž je odradila u Domu zdravlja Splitsko-dalmatinske županije te položila državni ispit 2010. godine. Nakon toga je radila kao liječnica u ambulanti obiteljske medicine u Banovoj Jarugi pri Domu zdravlja Kutina. Specijalizaciju iz kliničke mikrobiologije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb započela je 2011. godine, a 2016. godine položila specijalistički ispit. Od 2016. do 2018. radila je kao specijalistica kliničke mikrobiologije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a od 2018. godine u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“. Od listopada 2018. zaposlena je kao asistentica na Katedri za kliničku mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju pri Hrvatskom liječničkom zboru i Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektologiju. Udana je i majka troje djece.