

# Bokavirus kao respiratorni patogen dječje dobi

---

**Babić, Luka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:105:304591>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

**LUKA BABIĆ**

**BOKAVIRUS KAO RESPIRATORNI PATOGEN DJEČJE**

**DOBI**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju pod vodstvom prim. prof. dr. sc. Sunčance Ljubin Sternak i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## **POPIS POKRATA KORIŠTENIH U RADU**

**AOM** (eng. acute otitis media) – akutna upala srednjeg uha

**AST** – aspartat aminotransferaza

**BAL** – bronhoalveolarni lavat

**BPV** – *bovine parvovirus*

**CK-MB** (eng. creatine kinase MB) – kreatin kinaza MB

**CRP** – C-reaktivni protein

**CT** – kompjuterizirana tomografija

**DDR** (eng. DNA damage response) – mehanizam popravka DNA aktiviran oštećenjem

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**EGF** (eng. epidermal growth factor) – epidermalni faktor rasta

**EIA** (eng. enzyme immunoassay) – enzimski imunoesej

**HAE** (eng. human airway epithelium) – ljudski epitel dišnog puta

**HBoV** (eng. human bocavirus) – humani bokavirus

**HEK293** (eng. human embryonic kidney 293) – kultura stanica ljudskog embrionalnog bubrega

293

**HHV6** (eng. *human herpesvirus 6*) – ljudski herpesvirus 6

**Ig** - imunoglobulin

**IL** - interleukin

**KOPB** – kronična opstruktivna plućna bolest

**LDH** – laktat dehidrogenaza

**LEH** (eng. left end hairpin) – ukosnica lijevog kraja

**mL** - mililitar

**mRNA** (eng. messenger ribonucleic acid) – glasnička ribonukleinska kiselina

**MVC** (eng. minute virus of canines) – minutni virus pasa

**NP** (eng. nucleoprotein) – jezgreni protein

**NS1** (eng. nonstructural protein 1) – ne-strukturni protein 1

**PCR** (eng. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimeraze

**pre-mRNA** (eng. precursor messenger ribonucleic acid) – prekursorska glasnička ribonukleinska kiselina

**qPCR** (eng. quantitative PCR) – kvantitativni PCR

**REH** (eng. right end hairpin) – ukosnica desnog kraja

**RNA** (eng. ribonucleic acid) – ribonukleinska kiselina

**RSV** (eng. *respiratory syncytial virus*) – *respiratorni sincicijski virus*

**RT-PCR** (eng. reverse transcriptase PCR) – PCR reverznom transkriptazom

**TNF** (eng. tumor necrosis factor) – faktor nekroze tumora

**VEGF** (eng. vascular endothelial growth factor) – faktor rasta žilnog endotela

**VLP** (eng. virus-like particle) – čestica nalik virusu

**VP** (eng. viral protein) – virusni protein

# SADRŽAJ RADA

## I. SAŽETAK

## II. SUMMARY

1. UVOD.....	1
2. VIROLOGIJA.....	2
2.1. Klasifikacija bokavirusa.....	2
2.2. Građa bokavirusa.....	2
3. PATOGENEZA.....	4
4. KLINIČKA SLIKA.....	6
4.1. Bolesti dišnog sustava.....	6
4.1.1. Bolesti gornjeg dišnog sustava.....	6
4.1.2. Bolesti donjeg dišnog sustava.....	7
4.2. Ostale bolesti.....	10
4.2.1. Bolesti u dječjoj dobi.....	10
4.2.2. Bolesti u odrasloj dobi.....	12
5. RIZIČNI ČIMBENICI.....	13
6. EPIDEMIOLOGIJA .....	14
6.1. Prevalencija.....	14
6.2. Transmisija.....	16
7. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA.....	17
7.1. Molekularne metode.....	17
7.2. Serološke metode.....	19
8. LIJEČENJE.....	21
9. ZAKLJUČAK.....	23
10. ZAHVALE.....	24
11. POPIS LITERATURE.....	25
12. ŽIVOTOPIS.....	32

## **SAŽETAK**

### **Bokavirus kao respiratorni patogen dječje dobi**

### **Bocavirus as a respiratory pathogen in children**

Luka Babić

Humani bokavirus (HBoV) je virus iz porodice parvovirusa otkriven 2005. godine iz uzoraka respiratornog sustava djece sa akutnom infekcijom dišnog puta. Identificirana su četiri tipa HBoV-a; HBoV1 je primarno detektiran u dišnom sustavu, a HBoV2-4 u probavnom sustavu. Istraživanja pokazuju da je HBoV1 patogen koji uglavnom uzrokuje bolesti dišnog sustava dječje dobi dok uzročno-posljedična veza između detekcije HBoV2-4 i bolesti probavnog sustava još nije dokazana. Najčešći klinički entiteti bokavirusne infekcije u djece uključuju akutni bronhiolitis, pneumoniju, rinitis i akutni otitis media (AOM). Bolesti su uglavnom blagog tijeka i ne zahtijevaju hospitalizaciju, ali prijavljeni su slučajevi životno ugrožavajućih i fatalnih infekcija. Viremija tijekom akutne infekcije govori u prilog sistemske infekcije sa zahvaćanjem različitih organskih sustava. Poželjno je da virološka dijagnostika akutne bokavirusne infekcije uključuje kombinaciju molekularnih i seroloških metoda. Naime, karakteristika bokavirusne infekcije je produljeno izlučivanje virusa nakon akutne infekcije i česta kodetekcija/koinfekcija HBoV s ostalim respiratornim virusima što otežava interpretaciju pozitivnih nalaza. Rizikni čimbenici za bokavirusnu infekciju težeg kliničkog tijeka su, osim dječje dobi, imunodeficijencija i postojeće kronične bolesti dišnog sustava. Zasad ne postoji ciljani lijek ili cjepivo za HBoV te osnovu liječenja infekcije čini podupiruća terapija. HBoV je važan uzročnik bolesti dišnog sustava stoga je infekciju potrebno pravovremeno dijagnosticirati i pratiti njen klinički tijek radi preveniranja mogućih komplikacija u visokorizičnoj populaciji.

**KLJUČNE RIJEČI:** bokavirus, infekcija dišnog sustava, pedijatrijske infekcije, PCR

## **SUMMARY**

### **Bokavirus kao respiratorni patogen dječje dobi**

### **Bocavirus as a respiratory pathogen in children**

Luka Babić

Human bocavirus (HBoV) is a DNA virus belonging to the parvovirus family. It was discovered in 2005 in respiratory samples from children with acute respiratory tract infections. Four types of HBoV have been identified; HBoV1 is primarily detected in respiratory tract samples as opposed to HBoV2-4 which are primarily detected in the gastrointestinal tract. Various types of research show that HBoV1 is a true pathogen that mainly causes respiratory tract disease in children. The causal relationship between HBoV2-4 detection and gastrointestinal disease isn't proved yet. Frequent clinical features of bocaviral infection include acute bronchiolitis, pneumonia, rhinitis, and AOM. The disease course is often mild and similar to that caused by other respiratory viruses. There've been, however, cases of life-threatening and fatal infections. Viremia during acute infection suggests a systemic infection that can affect multiple organs. Laboratory diagnosis of acute bocaviral infection must include a combination of molecular and serological methods. Common findings in bocaviral infection include a high rate of detected co-infections and prolonged shedding of the virus which makes it hard to interpret positive results. Risk factors for severe bocaviral infection are young age, immunodeficiency, and existing chronic respiratory tract disease. So far there is no specific medicine and/or vaccine for bocavirus and the main therapeutic approach is supportive therapy. It is necessary to consider HBoV as a true pathogen so a prompt diagnosis can be made and complications prevented in a high-risk population.

**KEYWORDS:** bocavirus, respiratory tract infection, pediatric infections, PCR



## 1. UVOD

Humani bokavirus je prvi put otkriven 2005. godine u kliničkim uzorcima dišnog sustava djece oboljele od infekcija dišnog sustava. Ovaj virus pripada porodici *Parvoviridae* (1). Četiri godine kasnije, iz uzoraka stolice otkrivena su tri nova bokavirusa nazvana HBoV2-4 te je originalno otkriven virus 2005. godine nazvan HBoV1. HBoV2-4 su izolirani iz uzoraka djece sa simptomatskim infekcijama probavnog sustava, kao i u one djece bez simptoma (2,3). HBoV DNA je otad otkrivena u brojnim kliničkim uzorcima uključujući serum, urin, slinu, cerebrospinalni likvor i tonzilarno tkivo (4–7). Od ne-kliničkih uzoraka, HBoV DNA je otkrivena u otpadnim vodama, kanalizaciji, školjkašima i fecesu štakora (8–10). Pretpostavljeni mehanizam transmisije HBoV1 su respiratorne kapljice dok se za HBoV2-4 misli da se prenosi feko-oralnim putem zbog česte detekcije u uzorcima probavnog sustava (11). HBoV1 je najprevalentniji u uzorcima dječje dobi, a pretpostavlja se da do šeste godine života gotovo 100% djece postaje seropozitivno (12). Infekcija HBoV1 uzrokuje predominantno respiratornu bolest blagog kliničkog tijeka uz zabilježene sistemske infekcije sa zahvaćanjem različitih ciljnih organa (4,6,13,14). HBoV2-4 nisu potvrđeni uzročnici bolesti probavnog sustava (2). Jedna od karakteristika HBoV1 infekcije je velika učestalost koinfekcija drugim respiratornim i/ili probavnim virusima. Najčešće detektirani virusi uz HBoV su respiratorni sincicijski virus (RSV) i rinovirus (15,16). Zbog manjka animalnih modela i kultura stanica patogeneza bokavirusne infekcije ostaje dijelom nerazjašnjena. Unatoč čestim kodetekcijama HBoV1 s drugim respiratornim virusima i prisutstvu HBoV1 u kliničkim uzorcima djece bez simptoma, novija istraživanja pokazuju da je bokavirus važan uzročnik infekcija respiratornog sustava (17–19).

## 2. VIROLOGIJA

### 2.1 KLASIFIKACIJA VIRUSA

Parvovirusi su velika porodica malih, neovijenih, ikozahedralnih virusa čija se genetska uputa sastoji od jednolančane deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Ovisno o tipu stanice koju inficiraju, porodicu *Parvoviridae* dijelimo na potporodice *Parvovirinae* i *Densovirinae*. U potporodici *Parvovirinae* nalaze se parvovirusi koji inficiraju stanice kralježnjaka. Osim već poznatog ljudskog patogena *parvovirusa B19* koji pripada koljenu *Erythroparvovirus*, u potporodici *Parvovirinae* nalazi se koljeno *Bocaparvovirus* u kojem postoje četiri humana bokavirusa (HBoV1-4) (20). U istom koljenu nalaze se i dva poznata životinjska virusa – *bovine parvovirus (BPV)* i *canine minute virus (MVC)* (21). Zbog sličnosti sa genomom navedenih životinjskih virusa, bokavirus je nazvan prema njima (bo- (BPV), -ca (MVC)).

### 2.2 GRAĐA BOKAVIRUSA

Jednolančana DNA humanog bokavirusa sastoji se od 5543 nukleotida te je sa obje strane omeđena nejednakim krajevima oblika ukosnice koji su važni za replikaciju virusa (22). Takvi nejednaki krajevi svrstavaju humani bokavirus u kategoriju heterotelomernih virusa u kojih su ti krajevi nazvani ukosnica lijevog kraja (left-end hairpin, LEH) i ukosnica desnog kraja (right-end hairpin, REH). LEH i REH korespondiraju 3' i 5' kraju jednolančane DNA. LEH se sastoji od 140 nukleotida, a REH od 200 nukleotida. Također, humani bokavirus je autonoman parvovirus jer mu za replikaciju nije potreban drugi virus pomagač.

Genom humanog bokavirusa kodira 6 nestrukturnih proteina – NS1, NS1-70, NS2, NS3, NS4 i NP1 i 3 strukturalna proteina – VP1, VP2 i VP3. Također, HboV1 eksprimira unikatnu, malenu,

nekodirajuću ribonukleinsku kiselinu (RNA) nazvanu BocaSR koja ima važnu ulogu u ekspresiji spomenutih nestrukturnih proteina. BocaSR je ujedno i prva otkrivena nekodirajuća RNA pronađena u malim DNA virusima prepisana RNA polimerazom III (23).

Lijeva polovica genoma kodira nestrukturane proteine, a desna polovica kodira strukturne proteine. U sredini genoma nalazi se kod za specifičan nestrukturani protein NP1. Valja napomenuti kako tijekom transkripcije bokaparvovirusi proizvode samo jednu prekursorsku glasičku RNA (pre-mRNA). Iz nje alternativnom poliadenilacijom i alternativnim prekrajanjem (eng. splicing) nastaje niz transkripata virusne mRNA. Ovisno o točnom mjestu prekrajanja pre-mRNA nastaju različiti proteinski produkti (24,25).

NS1 je najveći nestrukturani protein koji ima važnu ulogu u replikaciji parvovirusa. Sastoji se od 3 funkcionalne domene sa aktivnošću endonukleaze, helikaze i aktivacije transkripcije (26). NS1-70 je skraćeni NS1 protein koji nema svoj C-terminalni kraj. Njegova je važnost sposobnost indukcije odgovora na oštećenje DNA (eng. DNA damage response, DDR) kojim doprinosi replikaciji virusa (27). Važnost nestrukturnih proteina NS2-4 još nije detaljno proučena, no pokazalo se kako je NS2 protein potreban za HBoV1 infekciju kulture stanica polariziranog ljudskog dišnog epitela (28).

NP1 ima višestruke uloge tijekom obrade virusne pre-mRNA. Utjecajem na prekrajanje i poliadenilaciju NP1 protein regulira ekspresiju kako NS proteina, tako i VP proteina (29).

BocaSR nastaje transkripcijom nekodirajuće regije (nukleotidi 5199-5388) genoma pozitivnog smisla pomoću RNA polimeraze III. Ova mala, nekodirajuća RNA je esencijalna za ekspresiju nestrukturnih proteina i replikaciju HBoV1 genoma (30). Pretpostavlja se kako će ova RNA u budućnosti evoluirati i omogućiti bokaparvovirusima bolju prilagodbu na domaćinov dišni i/ili probavni sustav. Također, djelovanje na BocaSR bi mogao biti potencijalni mehanizam cjepiva u budućnosti (7,14).

### 3. PATOGENEZA

Iako je bokavirus otkriven 2005. godine (1) njegova patogenezna do danas nije detaljno razjašnjena zbog nedostatka pogodnih, konvencionalnih kultura stanica i animalnih modela pomoću kojih bi se proučavao mehanizam nastanka infekcije (13). Prva studija koja je opisala replikaciju bokavirusa u kulturi stanica izvedena je 2009. godine. U ovoj studiji su autori nasadili klinički materijal (nazofaringealni aspirat) uzet od troje djece hospitalizirane zbog infekcije donjeg i gornjeg dišnog sustava. Materijal je nasađen na pseudostratificirani ljudski dišni epitel (human airway epithelium – HAE) koji je dobiven nasađivanjem primarnog ljudskog dišnog epitela na sučelje zrak-tekućina (air-liquid interface – ALI). Ova je studija dala ograničene rezultate vezane isključivo uz replikaciju virusa (31). Potom je 2012. godine tim znanstvenika uspio klonirati cijeli genom HBoV1 (izolat Salvador1) u plazmid kojim je transfecirana dostupna kultura stanica ljudskog embrionalnog bubrega 293 (human embryonic kidney 293 – HEK293). Ova je kultura stanica poduprla nastanak visokog broja infektivnih viriona kojim je zaražena polarizirana kultura HAE. Rezultati su pokazali značajne morfološke promjene epitela poput gubitka cilija, hipertrofije stanica i gubitka tijesnih spojeva između stanica. Navedene promjene sugeriraju kako HBoV1 infekcija narušava epitelnu barijeru te domaćin postaje skloniji sekundarnim infekcijama i ima veću permeabilnost za alergene iz okoliša (22,32). Daljnjim istraživanjima u kulturi polariziranog primarnog ljudskog dišnog epitela pokazano je da HBoV1 infekcija smanjuje transepitelni električni otpor, stanjuje epitel te u kasnim stadijima infekcije povećava jezgru stanica (33). Zbog povećanog lučenja viriona na apikalnoj strani pretpostavlja se da HBoV1 pokazuje tropizam za apikalnu stranu epitela, no također je pokazano da se infekcija uspostavlja i nakon bazolateralne aplikacije viriona, uz manje lučenje viriona nego pri inokulaciji na apikalnu stranu. Ovo se otkriće pokazalo važno zato što objašnjava potencijalnu infekciju cijelog dišnog sustava u bolesnika sa HBoV1 viremijom (33,34).

Analizom mehanizma smrti stanica zaraženih HBoV1 pokazano je da virus uzrokuje aktivaciju inflammasoma NLRP3 (eng. NLR family pyrin domain-containing 3 protein) koji pomoću kaspaze 1 izaziva piroptozu stanica. Uočeno je i povećano lučenje citokina interleukina 1 $\alpha$  i interleukina 18 (IL-1 $\alpha$  i IL-18). HBoV1 je zasad prvi respiratorni virus koji uzrokuje piroptozu stanica dišnog epitela jer povećava ekspresiju antiapoptotičkih gena. Smatra se da ovim mehanizmom HBoV1 ostvaruje perzistentnu infekciju (35).

Nadalje, pokazano je da se HBoV1 u kulturi primarnog dišnog epitela koji se ne dijeli replicira pomoću mehanizma popravka DNA (DDR) u kojem sudjeluju stanične DNA polimeraze iz Y-obitelji. Ova je studija ujedno i prva pokazala replikaciju gena autonomnog parvovirusa potpomognutu DNA polimerazama u mitotski neaktivnim stanicama (36).

Osim uočenog direktnog citopatskog učinka HBoV1 na dišni epitel, pokazalo se kako virus mijenja ekspresiju upalnih citokina povećavajući broj njihovih receptora. U kohortnom istraživanju je utvrđeno kako je u uzorcima bronhoalveolarnog lavata (BAL) u bolesnika sa dokazanom HBoV1 infekcijom uočena veća koncentracija citokina poput epidermalnog faktora rasta (EGF), faktora rasta žilnog endotela (VEGF), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i faktora nekroze tumora  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) za koje se predmnijeva da igraju ulogu u nastanku plućne fibroze i tumora (37).

Zasad se patogeneza HBoV1 bazira na njegovom direktnom citopatskom učinku, indukciji popravka DNA te indukciji lučenja citokina, no daljnja istraživanja na primjerenim animalnim modelima će dati više detalja o patogenezi virusa *in vivo*.

## 4. KLINIČKA SLIKA

Klasično dokazivanje uzročno-posljedične veze između mikroorganizma i infekcije koju uzrokuje podrazumijeva ispunjenje četiriju Kochovih postulata. U slučaju HBoV to nije moguće zbog manjka adekvatnih kultura stanica i animalnih modela za replikaciju virusa (38). Unatoč navedenom, brojne su studije pokazale kako je HBoV uistinu etiološki čimbenik primarno, ali ne i isključivo, respiratornih infekcija u dječjoj dobi. Među najčešćim kliničkim slikama HBoV infekcije nalaze se: prehlada, egzacerbacija astme, bronhiolitis, pneumonija i akutni otitis media (39–47). Simptomi bolesti uzrokovanih HBoV-om uključuju kašalj, rinoreju, dispneju, zviždanje u plućima (eng. wheezing), vrućicu, proljev i povraćanje (42,48). Iako HBoV uglavnom uzrokuje lake i srednje teške bolesti, dokumentirano je mnogo slučajeva životno ugrožavajućih i fatalnih infekcija (49–52).

### 4.1 BOLESTI DIŠNOG SUSTAVA

#### 4.1.1 Bolesti gornjeg dišnog sustava

Ispitivanje u kojem su kombinirani serološka dijagnostika, obrasci za evaluaciju simptoma i liječničko utvrđivanje dijagnoza pokazalo je da je primarna infekcija HBoV-om povezana sa simptomatskom infekcijom gornjeg dišnog sustava (43). Sekundarna infekcija nije nužno korelirala sa kliničkom slikom. Od kliničkih entiteta među infekcijama gornjeg dišnog sustava česti su rinitis, sinusitis i obična prehlada (44). Jedna studija opisuje ovisnost kliničke slike o količini i mjestu nalaska HBoV i/ili njegovih dijelova. Pronađena je korelacija između visoke količine virusa u nazofarinku i infekcije donjeg dišnog sustava, ali ne i gornjeg dišnog sustava. Ista korelacija vrijedi i za viremiju. Jedna je studija pokazala povezanost između velike količine detektiranog virusa i stope primitka u jedinicu za intenzivnu njegu (51). S druge strane, jedna

multicentrična slučaj-kontrola studija pokazala je da nema razlike u lokaciji infekcije između grupa ispitanika sa malim i velikim količinama detektiranog virusa (53). Iako je uzorak puno manji, sličan je rezultat dobiven i u jednom od hrvatskih istraživanja (54).

AOM je česta bolest djece i novorođenčadi. Iako je često klasificiran kao bakterijska bolest, novija istraživanja pokazuju sve veću ulogu respiratornih virusa kao etioloških čimbenika bolesti. Neki od tih virusa uključuju rinoviruse, RSV i humane metapneumoviruse. Nakon otkrića HBoV, mnogo je istraživanja pokazalo njegovu potencijalnu ulogu u nastanku bolesti, bilo kao primarni uzročnik ili kao virus pomagač. (45,55,56) Ovu tvdnju potvrđuje i dokaz HBoV u eksudatu srednjeg uha. (57) U istraživanju u kojem se proučavalo prisutstvo HBoV i rino-enterovirusa u djece sa eksudativnim otitis media, HBoV je pronađen u 13% uzoraka eksudata u usporedbi sa 29% uzoraka u kojima je identificiran enterovirus. (55) Druga je studija pronašla vrlo visoku incidenciju AOM u ispitanika kojima je dokazana mono-infekcija HBoV-om koja iznosi čak 52%. (56) Osim što je potencijalni etiološki čimbenik, HBoV može pogoršati kliničku sliku i trajanje AOM te povećati sklonost sekundarnoj bakterijskoj infekciji sa *S. pneumoniae*. (45)

#### 4.1.2 Bolesti donjeg dišnog sustava

Akutni bronhiolitis jedna je od najčešćih bolesti dišnog sustava u djece mlađe od dvije godine. Karakteriziraju ga upala, nekroza i edem dišnog epitela uz povećanu produkciju sluzi i bronhospazam sa posljedičnom opstrukcijom lumena koja se manifestira zvižducima i hipoksijom. Najčešći uzročnik ove bolesti je RSV (58). Iako je RSV najčešći uzročnik sa pretpostavljenom prevalencijom od 70%, novija meta-analiza pokazuje kako je HBoV1 infekcija u podlozi čak 13% bronhiolitisa u dobi manjoj od dvije godine u periodu između 2005. i 2019. godine. Unatoč relativno visokom postotku HBoV bronhiolitisa valja napomenuti kako

incidencija mono-infekcija virusom iznosi tek 4% što je tipično za HBoV (59). Finskom studijom je uspoređena klinička slika HBoV infekcije sa RSV infekcijom. Rezultati ove studije pokazuju kako su klinički tijek i težina bolesti uzrokovani HBoV-om i RSV-om slični. Također je pokazano da kašalj u HBoV pozitivnih traje dulje. Akutni otitis media bio je najčešći u grupi ispitanika sa mono-infekcijom RSV-om (5). U Hrvatskoj je u zimi 2016./2017. godine provedena studija u kojoj su se identificirali virusi u djece mlađe od tri godine hospitalizirane zbog infekcije donjeg dišnog sustava. Rezultati su pokazali kako je incidencija HBoV-a 23.1%, odmah nakon RSV-a sa incidencijom od 59.3%. I ova je studija pokazala svojstvo specifično HBoV-u, a to je visoka razina ko-detekcije drugih respiratornih virusa (51%) (60). Također, uočen je porast incidencije HBoV-a s dobi uz istovremeni pad incidencije RSV-a. Ovo zapaženje slaže se s rezultatima prethodnih studija u kojima je otkrivena visoka incidencija RSV-a u dobi manjoj od 12 mjeseci, a incidencija HBoV veća je u dobi iznad 12 mjeseci (60,61).

Pneumonija je važan uzrok morbiditeta i hospitalizacije pedijatrijske populacije. Zbog velikog broja potencijanih patogena i čestog nalaza ko-infekcija ponekad je teško pronaći pravog etiološkog uzročnika (58). Jedna ranija studija iz Tajlanda je pokazala značajnu povezanost između infekcije HBoV-om i pneumonije za koju je potrebna hospitalizacija. Na relativno velikom uzorku pacijenata sa radiološki dokazanom pneumonijom (n=1171) uz uzorak pacijenata sa infekcijom gornjeg dišnog sustava (n=512) i kontrolnu grupu (n=280), dokazan je gotovo četiri puta veći rizik od HBoV infekcije u pacijenata sa pneumonijom za razliku od kontrolne grupe. No, također je utvrđeno da u slučaju HBoV infekcije bez ko-infekcije ne postoji povećani rizik od pneumonije u usporedbi sa kontrolnom grupom. U cjelokupnoj studiji, HBoV je bio treći najčešći dokazani patogen u dobnoj skupini ispod pet godina, odmah nakon rinovirusa i RSV-a (41). U pneumoniji uzrokovanoj HBoV-om dokazanoj serološkim metodama utvrđen je snažan imunološki odgovor koji se manifestira nastankom protutijela i serokonverzijom do šeste godine života (62).



Astma je česta, kronična, upalna bolest dišnih puteva. Virusne infekcije su poznati rizični čimbenik egzacerbacija astme no uloga pojedinih vrsta virusa ostaje nejasna. Pregledom literature pokazano je da je HBoV u podlozi 6.9% egzacerbacija astme. Zanimljivost ovog rada je u činjenici da je HBoV kao uzročnik egzacerbacije bio češće dokazan u odrasloj nego u dječjoj populaciji (46). Osim što uzrokuje egzacerbacije, jedna je studija pokazala kako je HBoV bronhiolitis rizični faktor za nastanak astme. Praćenjem 80-ero djece koja su bila hospitalizirana zbog akutnog bronhiolitisa (10 uzrokovanih HBoV-om, a 70 RSV-om), pokazano je kako su sva djeca sa preboljelim HBoV bronhiolitisom razvila astmu i rekurentno zviždanje u periodu od pete do sedme godine života. Također, vrijednosti FEV<sub>1</sub> bile su manje u HBoV skupini (99.2 ± 4.8) nego u RSV skupini (103 ± 11) (47).

Nalaz rendgena pluća u pacijenata sa infekcijom donjeg dišnog sustava uzrokovanom HBoV-om često pokazuje atelektaze, intersticijske i/ili peribronhalne infiltrate i hiperinflaciju. Ostali laboratorijski parametri uključujući C-reaktivni protein (CRP) i broj leukocita su uglavnom umjereno povišeni tijekom akutne infekcije (13,40,62). Ipak, jedna je kineska studija pokazala značajnu razliku u nekim laboratorijskim parametrima između HBoV pozitivnih i negativnih ispitanika. Neki od tih nalaza uključuju povećanje aspartat aminotransferaze (AST), laktat dehidrogenaze (LDH), ureje i srčanog izoenzima kreatin kinaze (CK-MB). Promatrajući ove parametre zajedno moglo bi se pretpostaviti da HBoV infekcija osim respiratornih bolesti uzrokuje i direktnu i/ili imunosno posredovanu ozljedu ciljnih organa poput srca, jetre i bubrega (16).

## 4.2 OSTALE BOLESTI

### 4.2.1 Bolesti u dječjoj dobi

Nedugo nakon otkrića HBoV u kliničkim uzorcima iz dišnog sustava (1), tim znanstvenika u Španjolskoj otkriva HBoV u uzorcima stolice pedijatrijskih pacijenata (63). Daljnjim istraživanjima su detektirana dva nova bokavirusa – HBoV2 i HBoV3. Oba virusa su izolirana iz uzoraka stolice (64). Četvrti bokavirus, HBoV4, također izoliran iz stolice, otkriven je 2010. godine (2). Generalno, HBoV2 i HBoV3 su češće nađeni u uzorcima stolice za razliku od HBoV1 koji se često nalazi i u uzorcima stolice i u nazofarinksu. Iako postoje dokazi o nalasku svih četiriju humanih bokavirusa u uzorcima stolice, zasad nije dokazana uzročno-posljedična veza između nalaska HBoV2-4 DNA u stolici i pojave akutnog gastroenteritisa. Pojava HBoV1 DNA u stolici smatra se znakom respiratorne infekcije zbog vjerojatnog prijelaza virusnih čestica iz dišnoga u probavni sustav (65).

Kao i *parvovirus B19*, humani bokavirus pokazuje tropizam za tkivo miokarda (66). U literaturi postoji više prikaza slučajeva miokarditisa povezanog uz HBoV infekciju (6,67,68). 2011. godine u Iranu je opisan fatalni slučaj adenovirusne pneumonije komplicirane miokarditisom u dotad zdravog dvogodišnjaka. Uz adenovirus tip 7, iz kliničkih je uzoraka izoliran i bokavirus (68). Nadalje, u prikazu slučaja iz 2014. godine opisuje se subakutni miokarditis u dojenčeta starog osam tjedana uz dokazanu viremiju HBoV. Važnost ovoga prikaza je u tome što nije detektirana koinfekcija nekim drugim mikroorganizmom (67). Također, opisan je slučaj fatalnog subakutnog miokarditisa povezanog sa HBoV2 infekcijom. Obdukcijom je pokazana infiltracija miokarda mononuklearima, limfocitna infiltracija septuma te područja atrofije i fibroze. Postmortalnom analizom kliničkih materijala genom HBoV2 je identificiran u urinu, plazmi, skeletnom mišiću, ascitesu, plućnom tkivu i mezenteričnim limfnim čvorovima, ali nije dokazan u jetrenom i miokardijalnom tkivu. Dokaz genoma HBoV2 u plazmi i tkivima bez

drugim mikroorganizama sugerira potencijalnu kliničku važnost HBoV2 u patogenezi miokarditisa. Izostanak HBoV2 DNA u tkivu miokarda objašnjava se kliničkim tijekom bolesti koji nalaže da je subakutna faza karakterizirana imunološkim reakcijama domaćina, a ne direktnim učinkom virusa na miokard (6).

Encefalitis je upala moždanog parenhima sa posljedičnim neurološkim ispadima u vidu promjene stanja svijesti i fokalnih neuroloških ispada sa općim simptomima infekcije. Ova je bolest važan uzrok pobola i pomora na globalnoj razini. Incidencija u zapadnim zemljama za djecu iznosi minimalno 10 na 100000 godišnje (69). 2012. godine u Bangladešu objavljena je studija u kojoj su praćeni laboratorijski parametri te uzorci cerebrospinalnog likvora u 69-ero djece hospitalizirane zbog encefalitisa. U četiri uzorka cerebrospinalnog likvora PCR metodom je pronađena HBoV DNA, u dva uzorka je ona pripadala HBoV1, a u ostala dva uzorka HBoV2. Gen za VP1/2 virusa HBoV2 je osim u jednom uzorku likvora pronađen i u odgovarajućem uzorku seruma sa stopostotnom podudarnošću. Ni u kojem uzorku likvora nisu pronađena specifična protutijela, a u dva uzorka seruma su pronađena specifična IgG protutijela za HBoV1 i HBoV2. Također, od velike je važnosti otkriće čestica veličine 20-24 nm u jednom uzorku likvora. Navedene čestice vizualizirane elektronskim mikroskopom najvjerojatnije pripadaju HBoV-u. Dvoje od ukupne četvero djece sa bokavirusnim encefalitisom je preminulo (4). U drugoj pak studiji, HBoV DNA je također otkrivena u uzorcima cerebrospinalnog likvora (HBoV1 DNA u devet od 67, a HBoV2 u jednog od 67 ispitanika). Osim virusne DNA, u ovoj su studiji u uzorcima likvora pronađena i specifična IgG i IgM protutijela (70). Zbog već ustanovljene viremije tijekom infekcije bokavirusom, pretpostavlja se da HBoV hematogenom diseminacijom može uzrokovati encefalitis u djece (40).

Zabilježen je jedan slučaj hepatitisa u prethodno zdrave, imunokompetentne dvogodišnje djevojčice u kojoj je infekcija bokavirusom dokazana PCR metodom iz brisa nazofarinksa i iz uzorka pune krvi. HBoV je bio jedini dokazani patogen u oba klinička uzorka što ukazuje na

potencijalnu ulogu ovoga virusa u nastanku hepatitisa (14). Također, zabilježen je slučaj diseminirane HBoV infekcije uz hepatitis, kožne manifestacije i manjak respiratorne simptomatologije u imunodeficijentnog djeteta (71).

#### 4.2.2 Bolesti u odrasloj dobi

Poznato je da velika većina odraslih osoba ima specifična IgG protutijela za HBoV1 (5,41,72). Unatoč tome, zbog manjka istraživanja sa odraslim ispitanicima, teško je procijeniti točnu incidenciju akutne infekcije HBoV i posljedične bolesti (13). Retrospektivnom analizom je analizirana učestalost HBoV pneumonije u odraslih te su uspoređeni nalazi kompjuterizirane tomografije (CT) u imunokompetentnih i imunosuprimiranih ispitanika. Od 185 pacijenata sa dokazanom HBoV infekcijom, njih 110 (59.5%) imalo je pneumoniju. Statističkom analizom utvrđeno je kako je HBoV pneumonija povezana sa starijom dobi. Najčešći patološki nalazi na CT-u bili su bilateralna konsolidacija i uzorak 'mliječnog stakla', a centrilobularni noduli su pronađeni rijetko. CT nalaz između imunokompetentne skupine i imunosuprimirane skupine nije pokazao značajne razlike (73).

## 5. RIZIČNI ČIMBENICI

Rizični čimbenici za tešku infekciju humanim bokavirusom su slični rizičnim čimbenicima za infekciju bilo kojim respiratornim patogenom. Neki od njih su: kronične srčane i plućne bolesti (KOPB, plućna hipertenzija, cistična fibroza), nedonošenost, maligna bolest i imunodeficijencija (13). Zbog jakog i dugog imunološkog odgovora domaćina na infekciju HBoV-om koji je primarno posredovan B-limfocitima i stvaranjem protutijela, pretpostavlja se da je imunološka nedostatnost B-limfocita jedan od rizičnih čimbenika (5,72). Novija meta-analiza je pokazala da je dob manja od pet godina također jedan rizični faktor za nastanak teškog oblika infekcije, no valja naglasiti da je novorođenče do šestog mjeseca života zaštićeno putem majčinih protutijela (72,74). Danskom prospektivnom studijom su utvrđeni dodatni rizični čimbenici – rođenje zimi, astma u obiteljskoj anamnezi i pušenje majke (42).

Blizina otpadnih i kanalizacijskih voda u Tajlandu u kojima je dokazan HBoV (10) mogla bi biti potencijalan rizični čimbenik za infekciju bokavirusom. Također, loši higijenski uvjeti i nedostatak sanitacije bi mogli pridonijeti povećanom broju infekcija zbog potencijalnog feko-oralnog prijenosa virusa.

## 6. EPIDEMIOLOGIJA

### 6.1 PREVALENCIJA

Mnoge studije diljem svijeta pokazale su da je HBoV1 jedan od najčešće dokazanih respiratornih virusa u pedijatrijskoj populaciji (13). Podatci dobiveni meta-analizom pokazuju kako je prosječna prevalencija HBoV u respiratornim uzorcima na globalnoj razini 6.3%. U navedenoj meta-analizi korišteni su rezultati 311 studija o prevalenciji virusa sa ukupno 233761 ispitanika. Uz podatak o prevalenciji, u istoj je studiji objavljen i podatak o učestalosti ko-detekcije HBoV1 i ostalih respiratornih virusa. Rezultati pokazuju da stopa ko-detekcije iznosi 8.3 - 100 (17).

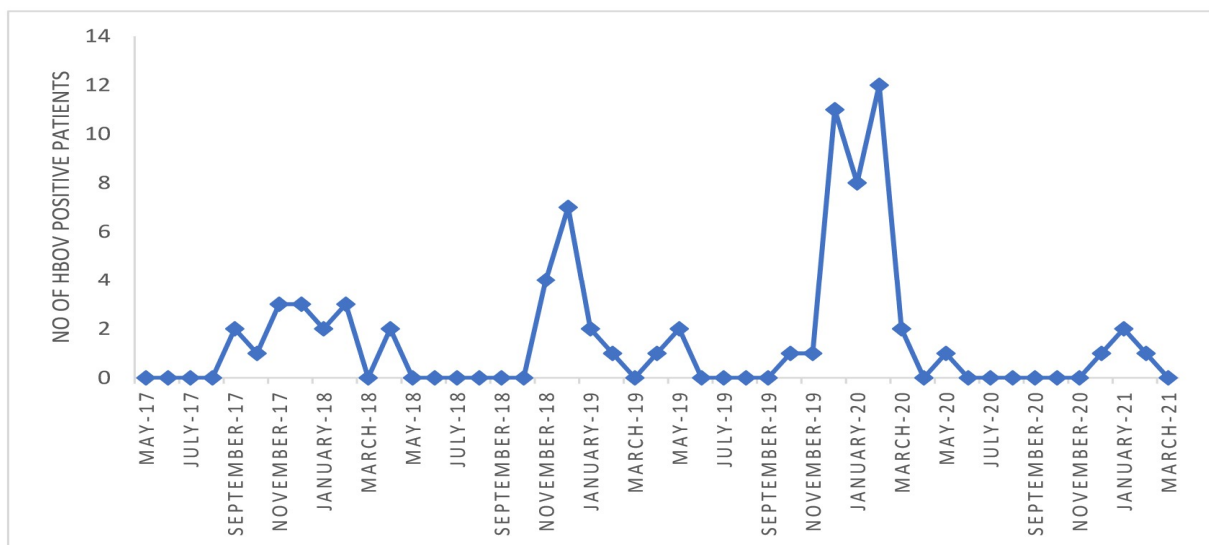
Kao što je već spomenuto u radu, HBoV je također izoliran iz probavnog sustava te je uzročno-posljedična veza između detekcije virusa u probavnom sustavu i akutnog gastroenteritisa i dalje nerazjašnjena. Ista meta-analiza daje i rezultate o prevalenciji HBoV u probavnom sustavu koja iznosi 5.9%, a stopa ko-detekcije drugih virusa u probavnom sustavu iznosi 46.7 (17).

U drugoj meta-analizi fokusiranoj na europske zemlje, prosječna prevalencija HBoV u dišnom sustavu u 32656 ispitanika iznosi 9.57%. U dobnoj skupini do 5 godina ona iznosi 9.70%, a u dobnoj skupini od 5 godina 9.30%. Također, rezultati ovog istraživanja pokazuju stopu mono-detekcije i ko-detekcije HBoV-a od 3.99 i 5.06 (74).

Uslijed izražene križne reaktivnosti protutijela na HBoV1-4 nije lako odrediti točnu seroprevalenciju pojedinih vrsta bokavirusa. Ovaj je problem nadvladan blokiranjem protutijela određenim epitopima virusa metodom enzimskog imunoeseja (eng. enzyme immuno-assay, EIA). Nakon ovog koraka, seroprevalencija HBoV1 iznosila je 80%, HBoV2 50%, HBoV3 10% i HBoV4 blizu nula posto u dobi od šest godina (12,34).

Jedna retrospektivna studija iz Hrvatske pokazuje relativno visok postotak detekcije HBoV1 u djece hospitalizirane zbog infekcije donjeg dišnog sustava. Od 295 ispitanika, među kojima ih je 225 sa dokazanom virusnom etiologijom bolesti, u njih 68 (23.1%) je detektiran HBoV1, odmah nakon RSV-a (175/295; 76.3%) (60).

Druga, prospektivna studija, pokazuje prevalenciju HBoV od 7.6% u 957 ispitanika u vremenskom periodu od četiri godine. Prevalencija u ovoj studiji je znatno manja nego u prethodnoj jer je ispitivana dobna skupina 0-18 godina, dok je u prethodnoj studiji ta skupina bila 0-3 godine. Također su u ovu studiju uključeni ispitanici i sa infekcijom gornjeg, kao i donjeg dišnog sustava. Rezultati ove studije koreliraju sa rezultatima studija na globalnoj razini. Također, najviše detektiranih HBoV1 infekcija zabilježeno je u zimskim mjesecima, od studenog do veljače (Slika 1), što korelira sa rezultatima drugih studija (11,75). Unatoč sličnim rezultatima različitih studija, valja spomenuti istraživanje na velikom uzorku u subtropskim dijelovima Kine koje je pokazalo da postoje dva vremenska perioda sa vrhom incidencije – zima (studeni-prosinac) i ljeto (lipanj-rujan) (18).



**Slika 1:** Vremenska distribucija detekcije HBoV u periodu od svibnja 2017. do ožujka 2021. godine u dvije hrvatske bolnice.

Preuzeto iz: Ljubin-Sternak S, Slović A, Mijač M, Jurković M, Forčić D, Ivković-Jureković I, et al. Prevalence and Molecular Characterization of Human Bocavirus Detected in Croatian Children with Respiratory Infection. *Viruses*. 2021 Aug 31;13(9):1728 (75).

Slika preuzeta uz dopuštenje autorice.

## 6.2 TRANSMISIJA

Brojnim studijama je dokazana velika količina HBoV DNA u brisevima ždrijela i nazofarinksa tijekom akutne faze bolesti dišnog sustava te se zbog toga pretpostavlja da je primaran način širenja HBoV-a respiratornim kapljicama preko dišnog sustava. Iz dišnog sustava virus ulazi i u krvotok, uzrokujući viremiju, i u probavni sustav. Virus stolicom izlazi iz probavnog sustava što ukazuje na potencijalan feko-oralan način prijenosa. Iz dišnog sustava virus izlazi kašljanjem (76). Prospektivna studija u kojoj je praćeno 87-ero imunokompetentne djece od rođenja do 18. mjeseca života pokazala je da je medijan trajanja izlučivanja virusa u uzorcima sline 50 dana, sa najduljim zabilježenim trajanjem od 402 dana. Istraživači su pokazali da testiranje sline na HBoV1 DNA ima veću osjetljivost od testiranja nazofaringealnog brisa (48).

Analiza kamenica iz Tajlanda dokazala je prisutstvo HBoV1 i HBoV2 što ukazuje na potencijalan prijenos ovog virusa hranom i/ili vodom (9). Također, analizom kanalizacije i otpadnih voda u Tajlandu dokazana je prisutnost HBoV2-4. HBoV2 je pronađen u čak 26.7% uzoraka kanalizacije, a samo u 2.9% uzoraka otpadnih voda (10).

U Kini je provedeno istraživanje u kojem je otkriven HBoV2 u uzorcima stolice štakora *Rattus norvegicus* sa prevalencijom od 0.84%. Iako je broj pozitivnih uzoraka bio malen, štakori bi mogli biti potencijalni nosioci HBoV-a (8).



## 7. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Zlatni standard za dijagnostiku virusnih infekcija dišnog sustava u današnje vrijeme je metoda lančane reakcije polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR). Kvantitativni PCR predstavlja preciznu metodu kojom se osim detekcije samih virusa može detektirati i količina virusa što omogućuje jasniju dijagnozu (61). Naime, 'klasičan, kvalitativan' PCR nije dostatan za dijagnozu akutne bokavirusne infekcije zbog produljenog izlučivanja virusa koje može trajati i do godinu dana i njegove perzistencije u tkivima poput tonzila (7,48,77). Serološke metode, iako jeftinije i jednostavnije za provedbu, također imaju nekoliko mana primarno zbog postojanja četiri tipa HBoV-a. Učestala križna reaktivnost protutijela na različite tipove HBoV-a i fenomen originalnog antigenskog utiskivanja (eng. original antigenic sin) otežavaju točnu dijagnozu (78,79). Spori razvoj protutijela čini dodatan problem te su time serološke metode neprimjenjive u samom početku bolesti. Stoga serologija ima najveću primjenu u retrospektivnim istraživanjima i kod dugotrajnih infekcija.

### 7.1 MOLEKULARNE METODE

PCR je metoda umnožavanja nukleinskih kiselina i detekcije nastalih produkata. Multipleks PCR omogućuje simultanu detekciju više različitih odsječaka nukleinskih kiselina virusa. PCR u realnom vremenu (eng. real-time PCR / quantitative PCR, qPCR) je metoda koja osim kvalitativne detekcije genomskog materijala omogućuje i njegovu kvantitativnu detekciju. Tehnika reverzne transkripcije omogućuje detekciju RNA metodom lančane reakcije polimeraze (eng. reverse transcriptase PCR, RT-PCR) (80–82). Novija metoda nazvana MT-PCR (eng. multiplex tandem PCR) sastoji se od dva koraka. U prvome koraku događa se pre-amplifikacija nukleinskih kiselina pomoću više početnica (eng. primer), a u drugome koraku se koristi drugi

set početnica koje povećavaju specifičnost i osjetljivost testa. Test se dovršava PCR metodom u stvarnome vremenu. Reultat se iskazuje kao intenzitet signala (1-5) (54,83).

Zbog već spomenute perzistencije i dugog izlučivanja HBoV-a, kvalitativni PCR često nije dovoljan za dijagnozu akutne infekcije uzrokovane HBoV-om. qPCR metoda pokazuje količinu virusne DNA u uzorcima izraženu u broju kopija po mililitru. Neke studije pokazale su da količina od  $10^4$  kopija HBoV po mL govori u prilog akutnoj infekciji (5), dok drugi autori navode količinu od  $10^6$  kopija po mL kao značajnu za dijagnozu akutne infekcije (79,84). Finskom studijom iz 2017. godine koja je uspoređivala RT-PCR za dokaz HBoV mRNA, qPCR i serološke metode je utvrđeno da qPCR iz uzoraka brisa nazofarinksa ima visoku kliničku osjetljivost od 100%, ali nisku specifičnost od 76% u usporedbi sa serološkim metodama. U istoj usporedbi, RT-PCR za dokaz HBoV mRNA je pokazao nisku osjetljivost (75%), ali visoku specifičnost (96%). Stoga se čini da dokaz bokavirusne mRNA uz detekciju visoke količine HBoV DNA u uzorcima dišnog sustava govori u prilog akutnoj infekciji. Tome u prilog govori i opažanje navedene studije u koju je bio uključen 121 ispitanik – svi ispitanici iz kontrolne grupe (qPCR DNA negativni) bili su negativni i na HBoV mRNA (84).

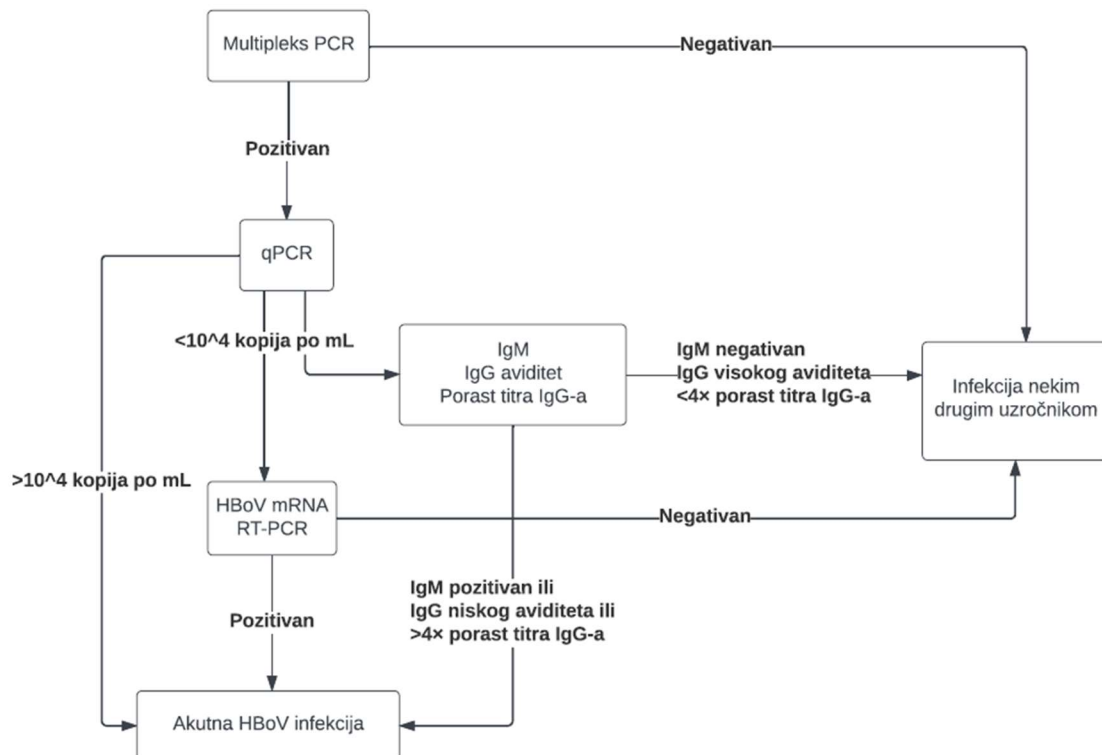
U jednom od novijih hrvatskih istraživanja uspoređivani su rezultati MT-PCR i qPCR metode za dokaz HBoV u uzorcima dišnog sustava u kojima je istodobno dokazan HBoV u kodetekciji sa jednim ili više drugih respiratornih virusa. qPCR metodom je utvrđena velika količina virusne DNA u 28/55 uzoraka. Od tih 28 uzoraka, MT-PCR metodom je otkriven visok intenzitet signala (4 i 5) u njih čak 25. Deset uzoraka s pozitivnim rezultatom na multipleks PCR-u bilo je negativno na MT-PCR-u, a od tih deset, sedam je također bilo negativno na qPCR-u, što govori u prilog većoj specifičnosti ove metode u odnosu na multipleks PCR (54).

## 7.2 SEROLOŠKE METODE

Uslijed djelomične sličnosti genoma HBoV1-4, križna reaktivnost protutijela na različite tipove ovog virusa je česta te otežava egzaktnu dijagnozu HBoV1 infekcije. Uz križnu preosjetljivost, za HBoV je potvrđen i fenomen originalnog antigenskog utiskivanja. Ova pojava se događa kada imunološki odgovor domaćina na infekciju nekim drugim tipom iste vrste virusa uzrokuje stvaranje protutijela koja djeluju na virus kojim je domaćin bio inficiran prvi put. Drugim riječima, imunološki odgovor u re-infekciji proizvodi protutijela usmjerena na patogen koji je uzrokovao primarnu infekciju. Opisane pojave treba uzeti u obzir pri interpretaciji nalaza seroloških testiranja (78,79).

Za serološku dijagnostiku parvovirusa se koristi antigen smješten na VP1 proteinu, no pokazalo se da VP1 HBoV-a nije dovoljno imunogen. Umjesto njega se koristi VP2 protein eksprimiran na VLP-u za provođenje EIA-a (5,20,34). U usporedbi sa molekularnim metodama, pokazano je da serološke metode imaju veću specifičnost, ali manju osjetljivost. Korištenjem isključivo seroloških metoda pretpostavlja se da bi se broj stvarno inficiranih osoba podcijenio uslijed navedenih imunoloških mehanizama i vremena potrebnog da se stvore protutijela tijekom infekcije (79,85). Također, za praćenje kinetike titra protutijela potreban je paran uzorak seruma sa razmakom od minimalno 14 dana. Unatoč potencijalnim manama serološke dijagnostike, pokazalo se da dokaz IgM protutijela i serokonverzija ili dijagnostički porast titra IgG protutijela imaju veću specifičnost od qPCR metode (5). Dodatan serološki dokaz akutne HBoV infekcije je pozitivan IgG niskog aviditeta (86). Daljnja istraživanja trebala bi pokazati točniju kinetiku IgM i IgG protutijela uz definiranje kinetike HBoV mRNA i njenog značaja u akutnoj infekciji.

Pretpostavljeni zlatni standard dijagnostike HBoV-a uključuje kombinaciju molekularnih i seroloških metoda. Molekularnim metodama se može detektirati visoka količina HBoV DNA (qPCR/MT-PCR) ili HBoV mRNA (RT-PCR). U slučaju kada se ne radi o testovima koji mogu odrediti količinu virusa u uzorku ili pokazatelje aktivne replikacije (mRNA) potrebno je pozitivan nalaz potvrditi barem jednim od sljedećih seroloških pokazatelja: pozitivnim IgM u serumu, četverostrukim porastom titra IgG i/ili niskim aviditetom IgG (11,13). (Slika 2)



**Slika 2:** Hodogram dijagnostičkih metoda za dokaz akutne infekcije humanim bokavirusom.

HBoV=humani bokavirus. PCR=lančana reakcija polimerazom. qPCR=kvantitativni PCR. RT-PCR=PCR reverznom transkriptazom. IgM=imunoglobulin M. IgG=imunoglobulin G.

Za mjerenje kinetike titra protutijela potrebna su dva uzorka seruma uzeta s razmakom od barem 14 dana.

## 8. LIJEČENJE

Od otkrića humanog bokavirusa prošlo je 17 godina (1) te do danas nije otkrivena specifična terapija i/ili metoda prevencije. Kao i za ostale respiratorne infekcije virusne etiologije, i za infekciju bokavirusom je osnovno načelo liječenja simptomatska terapija koja obuhvaća uporabu bronhodilatatora (primarno kratkodjelujućih  $\beta_2$  agonista), oksigenoterapiju i antikongestivne lijekove (11). Provedena je studija u kojoj se ispitala efikasnost primjene prednizolona u djece hospitalizirane zbog akutnog zviždanja u plućima sa serološki dokazanom HBoV infekcijom. Praćeni ishodi su uključivali duljinu hospitalizacije, trajanje simptoma nakon otpusta iz bolnice i pojavu relapsa bolesti unutar dva mjeseca od otpusta. Usporedbom rezultata između grupe koja je primala prednizolon i grupe koja je primala placebo pokazalo se da primjena prednizolona u HBoV infekciji nema značajne učinkovitosti (87). Postoji jedan zanimljiv prikaz slučaja koji opisuje teški proljev u pacijenta sa detektiranim HBoV1 i *humanim herpesvirusom 6* (HHV6). Neočekivano, nakon primjene cidofovira, dotad dokazivan HBoV u stolici više nije bio detektiran. Navedeno opažanje sugerira ili direktni učinak ovoga antiviralnog lijeka na HBoV, ili posredan učinak preko HHV6 koji je potencijalno potreban za replikaciju HBoV-a (88).

Osim suportivne terapije, potreban je veći oprez pri primjeni antimikrobnih lijekova tijekom akutne HBoV infekcije. Nekoliko je studija prijavilo veliku incidenciju primjene antibiotika u pacijenata sa akutnom HBoV infekcijom. Osim što nisu efikasni pri liječenju akutne bokavirusne infekcije, njihova empirijska primjena uvelike povećava bakterijsku rezistenciju i pogoršava ovaj svjetski javnozdrastveni problem. (38% - 93%) (11,54).

Studija provedena na miševima pokazala je jak humoralni i stanični imunološki odgovor na VP2 protein esprimiran na VLP-u i time sugerirala potencijalnu ulogu navedenog proteina u proizvodnji cjepiva (89). Također, istraživanjima *in silico* pretpostavljeni su antigenski epitopi

koji potenciraju poliklonalni odgovor T limfocita i koji bi potencijalno mogli imati ulogu u nastanku cjepiva za HBoV u budućnosti (90).

## 9. ZAKLJUČAK

Humani bokavirus je noviji parvovirus koji primarno uzrokuje respiratorne infekcije u dječjoj dobi. HBoV1 ima najveću prevalenciju i uglavnom je izoliran iz uzoraka dišnog sustava (nazofaringealni aspirat, BAL). HBoV2-4 su prevalentniji u uzorcima probavnog sustava uz zasad nejasnu povezanost između detekcije virusa i bolesti probavnog sustava. Zbog visoke prevalencije i učestalog utvrđivanja koinfekcija drugim respiratornim virusima teško je utvrditi jasnu uzročno-posljedičnu vezu između detekcije virusa i pojave bolesti dišnog sustava. Najveća učestalost HBoV infekcije je u dječjoj dobi te je dob manja od pet godina utvrđena kao rizični čimbenik za nastanak infekcije. Infekcija HBoV-om ima niz kliničkih manifestacija od kojih su najčešće akutni bronhiolitis, pneumonija, rinitis i akutni otitis media. Tijekom infekcije može doći do viremije i posljedične sustavne infekcije uz zahvaćanje različitih organskih sustava. Molekularne metode laboratorijske dijagnostike daju ograničene rezultate zbog učestalih koinfekcija i dugog vremena izlučivanja virusa. Serološke metode također daju ograničene rezultate zbog visoke prevalencije protutijela i velikog postotka križne reaktivnosti između različitih vrsta HBoV-a. Stoga je pretpostavljeno da je za dokaz akutne HBoV infekcije potrebna kombinacija ovih dviju metoda – velika količina virusa u brisu nazofarinksa dokazana qPCR-om ili dokaz HBoV mRNA, a kvantitativni dokaz bi trebalo potvrditi pozitivnim IgM-om u serumu, IgG-om niskog aviditeta ili četverostrukim porastom titra IgG-a. Za infekciju bokavirusom nema specifičnog lijeka te je simptomatsko liječenje osnovni terapijski modalitet. Iako su kliničke slike uzrokovane bokavirusom uglavnom blage, zbog opaženih fatalnih slučajeva od velike je važnosti rano dijagnosticirati bolest i prevenirati komplikacije. Buduća istraživanja trebala bi detaljnije opisati patogenezu, klinički značaj koinfekcija i mehanizme djelovanja potencijalnog lijeka uključujući i cjepivo.

## **10. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojoj mentorici prim. prof. dr. sc. Sunčanici Ljubin Sternak na danim savjetima, usmjeravanju i strpljenju prilikom pisanja ovoga rada.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i pruženoj pomoći tijekom studija medicine.



## 11. POPIS LITERATURE

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 U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12891–6.
2. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010 Jun 1;201(11):1633–43.
3. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009 Jan 15;199(2):196–200.
4. Mitui MT, Shahnawaz Bin Tabib SM, Matsumoto T, Khanam W, Ahmed S, Mori D, et al. Detection of Human Bocavirus in the Cerebrospinal Fluid of Children With Encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr 1;54(7):964–7.
5. Söderlund-Venermo M, Lahtinen A, Jartti T, Hedman L, Kemppainen K, Lehtinen P, et al. Clinical Assessment and Improved Diagnosis of Bocavirus-induced Wheezing in Children, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009 Sep;15(9):1423–30.
6. Brebion A, Vanlieferinghen P, Déchelotte P, Boutry M, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. Fatal Subacute Myocarditis Associated with Human Bocavirus 2 in a 13-Month-Old Child. *J Clin Microbiol*. 2020 Dec 21;52(3):1006–8.
7. Xu M, Perdomo MF, Mattola S, Pyöriä L, Toppinen M, Qiu J, et al. Persistence of Human Bocavirus 1 in Tonsillar Germinal Centers and Antibody-Dependent Enhancement of Infection. *mBio*. 2021 Feb 2;12(1):10.1128/mbio.03132-20.
8. You FF, Zhang MY, Wu F, Li QS, Chen Q. Human bocavirus 2 detected in *Rattus norvegicus* feces in China. *Arch Virol*. 2022 Jan 1;167(1):171–5.
9. Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Maneekarn N. Predominance of Human Bocavirus Genotypes 1 and 2 in Oysters in Thailand. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Jul 27;87(16):e0045621.
10. Booranathawornsom T, Pombubpa K, Tipayamongkholgul M, Kittigul L. Molecular characterization of human bocavirus in recycled water and sewage sludge in Thailand. *Infect Genet Evol*. 2022 Jun 1;100:105276.
11. Trapani S, Caporizzi A, Ricci S, Indolfi G. Human Bocavirus in Childhood: A True Respiratory Pathogen or a “Passenger” Virus? A Comprehensive Review. *Microorganisms*. 2023 May;11(5):1243.
12. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, et al. Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1–4. *J Infect Dis*. 2011 Nov 1;204(9):1403–12.
13. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, et al. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. 2019 Jun 1;3(6):418–26.

14. Haytoğlu Z, Canan O. Bocavirus Viremia and Hepatitis in an Immunocompetent Child. *Balk Med J.* 2017 May;34(3):281–3.
15. Ademhan Tural D, Yalcin E, Emiralioglu N, Ozsezen B, Alp A, Sunman B, et al. 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.
16. Wang W, Guan R, Liu Z, Zhang F, Sun R, Liu S, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of human bocavirus infection in children hospitalized for acute respiratory tract infection in Qingdao, China. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 14];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.935688>
17. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol.* 2016 Oct 21;22(39):8684–97.
18. Liu WK, Liu Q, Chen DH, Tan WP, Cai Y, Qiu SY, et al. Epidemiology of HBoV1 infection and relationship with meteorological conditions in hospitalized pediatric patients with acute respiratory illness: a 7-year study in a subtropical region. *BMC Infect Dis.* 2018 Jul 16;18(1):329.
19. De R, Zhang KX, Wang F, Zhou YT, Sun Y, Chen DM, et al. Human bocavirus 1 is a genuine pathogen for acute respiratory tract infection in pediatric patients determined by nucleic acid, antigen, and serology tests. *Front Microbiol.* 2022 Jul 29;13:932858.
20. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Nov 2;30(1):43–113.
21. Kerr J, Cotmore S, Bloom ME. *Parvoviruses.* CRC Press; 2005. 657 p.
22. Huang Q, Deng X, Yan Z, Cheng F, Luo Y, Shen W, et al. Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia. *PLOS Pathog.* 2012 kol;8(8):e1002899.
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.
24. Sun Y, Chen AY, Cheng F, Guan W, Johnson FB, Qiu J. Molecular Characterization of Infectious Clones of the Minute Virus of Canines Reveals Unique Features of Bocaviruses. *J Virol.* 2009 Apr 15;83(8):3956–67.
25. Qiu J, Cheng F, Johnson FB, Pintel D. The transcription profile of the bocavirus bovine parvovirus is unlike those of previously characterized parvoviruses. *J Virol.* 2007 Nov;81(21):12080–5.
26. Tewary SK, Zhao H, Shen W, Qiu J, Tang L. Structure of the NS1 Protein N-Terminal Origin Recognition/Nickase Domain from the Emerging Human Bocavirus. *J Virol.* 2013 Nov;87(21):11487–93.

27. Deng X, Xu P, Zou W, Shen W, Peng J, Liu K, et al. DNA Damage Signaling Is Required for Replication of Human Bocavirus 1 DNA in Dividing HEK293 Cells. *J Virol*. 2017 Jan 1;91(1):e01831-16.
28. Shen W, Deng X, Zou W, Cheng F, Engelhardt JF, Yan Z, et al. Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1. *J Virol*. 2015 Oct;89(19):10097–109.
29. Fasina OO, Stupps S, Figueroa-Cuilan W, Pintel DJ. Minute Virus of Canines NP1 Protein Governs the Expression of a Subset of Essential Nonstructural Proteins via Its Role in RNA Processing. *J Virol*. 2017 Jun 15;91(12):e00260-17.
30. Wang Z, Shen W, Cheng F, Deng X, Engelhardt JF, Yan Z, et al. Parvovirus Expresses a Small Noncoding RNA That Plays an Essential Role in Virus Replication. *J Virol*. 2017 Apr 15;91(8):e02375-16.
31. 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 Aug;83(15):7739–48.
32. Karp PH, Moninger TO, Weber SP, Nesselhauf TS, Launspach JL, Zabner J, et al. An in vitro model of differentiated human airway epithelia. Methods for establishing primary cultures. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2002;188:115–37.
33. Deng X, Yan Z, Luo Y, Xu J, Cheng F, Li Y, et al. *In Vitro* Modeling of Human Bocavirus 1 Infection of Polarized Primary Human Airway Epithelia. *J Virol*. 2013 Apr;87(7):4097–102.
34. Kantola K, Hedman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Feb 15;46(4):540–6.
35. Deng X, Zou W, Xiong M, Wang Z, Engelhardt JF, Ye SQ, et al. Human Parvovirus Infection of Human Airway Epithelia Induces Pyroptotic Cell Death by Inhibiting Apoptosis. *J Virol*. 2017 Dec 15;91(24):e01533-17.
36. 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 sij;12(1):e1005399.
37. Khalfaoui S, Eichhorn V, Karagiannidis C, Bayh I, Brockmann M, Pieper M, et al. Lung Infection by Human Bocavirus Induces the Release of Profibrotic Mediator Cytokines In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE*. 2016 Jan 25;11(1):e0147010.
38. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2008 Jan;41(1):29–33.
39. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. 2012 Jan;22(1):46–64.
40. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Usterback R, et al. Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr 1;44(7):904–10.

41. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human Bocavirus: A Novel Parvovirus Epidemiologically Associated with Pneumonia Requiring Hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007 Apr 1;195(7):1038–45.
42. 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 Oct;27(10):897–902.
43. Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, Rognlien AGW, Døllner H. Human bocavirus in children: Mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010 Nov;49(3):158–62.
44. Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Simell S, et al. Association of Human Bocavirus 1 Infection with Respiratory Disease in Childhood Follow-up Study, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb;18(2):264–71.
45. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Billal DS, et al. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr*. 2009 Nov;168(11):1365–72.
46. 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 Apr;163(4):845–53.
47. 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(5):410–4.
48. Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. *J Infect Dis*. 2015 Aug 15;212(4):516–24.
49. 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 Feb;50(2):531–2.
50. Huynh J, Mos K, Kesson A, Egan J, Singhal N. Believing bocavirus: A rare cause of life-threatening acute respiratory distress syndrome requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Paediatr Child Health*. 2020 Oct;56(10):1634.
51. Moesker FM, van Kampen JJA, van der Eijk AA, van Rossum AMC, de Hoog M, Schutten M, et al. Human bocavirus infection as a cause of severe acute respiratory tract infection in children. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):964.e1-8.
52. Jula A, Waris M, Kantola K, Peltola V, Söderlund-Venermo M, Hedman K, et al. Primary and Secondary Human Bocavirus 1 Infections in a Family, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2013 Aug;19(8):1328–31.
53. Feikin DR, Fu W, Park DE, Shi Q, Higdon MM, Baggett HC, et al. Is Higher Viral Load in the Upper Respiratory Tract Associated With Severe Pneumonia? Findings From the PERCH Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2017 Jun 15;64(suppl\_3):S337–46.

54. 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*. 2023 Feb 23;13(5):846.
55. Rezes S, Söderlund-Venermo M, Roivainen M, Kempainen K, Szabó Z, Sziklai I, et al. Human bocavirus and rhino-enteroviruses in childhood otitis media with effusion. *J Clin Virol*. 2009 Nov 1;46(3):234–7.
56. 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 Pediatr Infect Dis Soc*. 2014 Jun 1;3(2):98–103.
57. Ruohola A, Meurman O, Nikkari S, Skottman T, Salmi A, Waris M, et al. Microbiology of acute otitis media in children with tympanostomy tubes: prevalences of bacteria and viruses. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006 Dec 1;43(11):1417–22.
58. Pavia AT. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 May 1;52(Suppl 4):S284–9.
59. Falahi S, Sayyadi H, Abdoli A, Kenarkoohi A, Mohammadi S. The prevalence of human bocavirus in <2-year-old children with acute bronchiolitis. *New Microbes New Infect*. 2020 Sep;37:100736.
60. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Ivković-Jureković I, Tešović G, Mlinarić-Galinović G, Lukšić I, et al. High Detection Rates of Human Bocavirus in Infants and Small Children with Lower Respiratory Tract Infection from Croatia. *Clin Lab [Internet]*. 2019 [cited 2023 May 3];65(01+02/2019). Available from: <http://www.clin-lab-publications.com/article/2910>
61. Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev*. 2013 Mar;14(1):38–45.
62. Don M, Söderlund-Venermo M, Valent F, Lahtinen A, Hedman L, Canciani M, et al. Serologically verified human bocavirus pneumonia in children. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Feb;45(2):120–6.
63. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human Bocavirus, a Respiratory and Enteric Virus. *Emerg Infect Dis*. 2007 Apr;13(4):636–7.
64. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009 Apr;5(4):e1000391.
65. Paloniemi M, Lappalainen S, Salminen M, Kähkö M, Kantola K, Hedman L, et al. Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. *Eur J Pediatr*. 2014 Aug;173(8):1051–7.
66. Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, et al. Prevalence of Parvovirus B19 and Human Bocavirus DNA in the Heart of Patients with no Evidence of Dilated Cardiomyopathy or Myocarditis. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1660–6.

67. Sallmon H, Lopez E, Weber S, Herrmann S, Berger F, Haverkämper G. Subacute Myocarditis Associated with Bocavirus Infection in an 8-Week-Old Infant. *Klin Pädiatr.* 2017 Mar;229(2):103–5.
68. Heydari H, Mamishi S, Khotaei GT, Moradi S. Fatal type 7 adenovirus associated with human bocavirus infection in a healthy child. *J Med Virol.* 2011;83(10):1762–3.
69. Jmor F, Emsley HC, Fischer M, Solomon T, Lewthwaite P. The incidence of acute encephalitis syndrome in Western industrialised and tropical countries. *Virology.* 2008 Oct 30;5(1):134.
70. Yu J mei, Chen Q qian, Hao Y xia, Yu T, Zeng S zhen, Wu X bing, et al. Identification of human bocaviruses in the cerebrospinal fluid of children hospitalized with encephalitis in China. *J Clin Virol.* 2013 Aug 1;57(4):374–7.
71. Kainulainen L, Waris M, Söderlund-Venermo M, Allander T, Hedman K, Ruuskanen O. Hepatitis and human bocavirus primary infection in a child with T-cell deficiency. *J Clin Microbiol.* 2008 Dec;46(12):4104–5.
72. Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3218–23.
73. 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 Jul 1;20(7):1226–35.
74. 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):2451–61.
75. Ljubin-Sternak S, Slović A, Mijač M, Jurković M, Forčić D, Ivković-Jureković I, et al. Prevalence and Molecular Characterization of Human Bocavirus Detected in Croatian Children with Respiratory Infection. *Viruses.* 2021 Aug 31;13(9):1728.
76. Schildgen O. Human Bocavirus: Lessons Learned to Date. *Pathogens.* 2013 Jan 11;2(1):1–12.
77. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, et al. Frequent and Prolonged Shedding of Bocavirus in Young Children Attending Daycare. *J Infect Dis.* 2010 Jun 1;201(11):1625–32.
78. 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 Oct;96(10):3099–108.
79. Kantola K, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Partanen J, et al. B-Cell Responses to Human Bocaviruses 1–4: New Insights from a Childhood Follow-Up Study. *PLoS ONE.* 2015 Sep 29;10(9):e0139096.
80. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350–4.

81. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487–91.
82. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol Nat Publ Co*. 1993 Sep;11(9):1026–30.
83. Stanley KK. Multiplexed tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection. *Nucleic Acids Res*. 2005 Nov 27;33(20):e180–e180.
84. Xu M, Arku B, Jartti T, Koskinen J, Peltola V, Hedman K, et al. 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 May 15;215(10):1551–7.
85. Nascimento-Carvalho AC, Vilas-Boas AL, Fontoura MSH, Xu M, Vuorinen T, Söderlund-Venermo M, et al. Serologically diagnosed acute human bocavirus 1 infection in childhood community-acquired pneumonia. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Jan;53(1):88–94.
86. Hedman L, Söderlund-Venermo M, Jartti T, Ruuskanen O, Hedman K. Dating of human bocavirus infection with protein-denaturing IgG-avidity assays-Secondary immune activations are ubiquitous in immunocompetent adults. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2010 May;48(1):44–8.
87. 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 Jun;30(6):521–3.
88. Streiter M, Malecki M, Prokop A, Schildgen V, Lüsebrink J, Guggemos A, et al. Does human bocavirus infection depend on helper viruses? A challenging case report. *Virol J*. 2011 Aug 29;8:417.
89. Deng ZH, Hao YX, Yao LH, Xie ZP, Gao HC, Xie LY, et al. Immunogenicity of recombinant human bocavirus-1,2 VP2 gene virus-like particles in mice. *Immunology*. 2014;142(1):58–66.
90. Kalyanaraman N. In silico prediction of potential vaccine candidates on capsid protein of human bocavirus 1. *Mol Immunol*. 2018 Jan 1;93:193–205.

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 24. ožujka 1999. godine. Osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ 'Vugrovec-Kašina i GŠ 'Zlatko Grgošević' završio sam 2014. godine. Iste godine sam upisao program prirodoslovne gimnazije u 'Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga' u Zagrebu. Paralelno sam pohađao GŠ 'Pavao Markovac' u Zagrebu. 2018. godine završavam srednjoškolsko gimnazijsko obrazovanje i paralelno stječem srednju stručnu spremu glazbenika violista. Iste godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija sam bio demonstrator na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju i na Katedri za internu medicinu ( kolegij 'Klinička propedeutika').

Osim aktivnosti u sklopu fakulteta, godinu dana sam radio na poziciji 'expert contributor' tvrtke Quizlet Inc. i povremeno sam obavljao sezonske poslove u kuhinji.

Aktivno se služim engleskim jezikom u govoru i pismu. Poznajem osnove rada na računalu. Posjedujem vozačku dozvolu za 'B kategoriju' vozila.