

Edyta Abramczuk^{1*}, Katarzyna Pancer¹, Włodzimierz Gut¹,
Bogumiła Litwińska¹

¹Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Epidemiologia zakażeń HBoV. 3. Charakterystyka bokawirusów człowieka. 4. Mechanizmy umożliwiające przetrwanie genomu HBoV w zakażonej komórce. 5. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie HBoV. 6. Laboratoryjna diagnostyka zakażeń bokawirusami. 7. Bokawirusy a zakażenia mieszane. 8. Podsumowanie

Human bocavirus – characteristics, pathogenicity, occurrence

Abstract: In this article, the characteristics of *human Bocaviruses* (HBoV) are presented. The viruses were described for the first time in 2005. The symptoms of HBoV infection are: cough, coryza, sore throat, breathing difficulty, but also nausea, vomiting and diarrhea. Four types of *Bocaviruses* are associated with human respiratory and gastrointestinal tract infections. HBoV1 is the main etiologic agent of respiratory tract infections, whereas HBoV2 causes gastrointestinal diseases. *Bocaviruses* can cause mild, asymptomatic infections as well as severe respiratory diseases, like pneumonia and bronchiolitis. HBoV2 is the third agent, after *Rotaviruses* and *Astroviruses*, which causes acute gastroenteritis in children. The treatment of HBoV infections is usually symptomatic. The HBoV diagnosis is mainly based on molecular techniques, such as quantitative PCR, serological tests are only used for epidemiological purposes. Infections due to HBoV occur during the whole human life, but they are most frequent in children from 6 month- to 3 year-old. HBoV infections are common all over the world and, when detected, in Poland too. Infections occur throughout the year, but are most common in the winter season.

The high rate of co-detection of HBoV with other viruses has been reported (82% samples). HBoV2 is the most frequently identified virus in co-infections with *Noroviruses*, *Rotaviruses* and *Astroviruses*, while HBoV1 – with RSV and HMPV.

1. Introduction. 2. Epidemiology of HBoV infections. 3. Characteristics of human bocavirus. 4. Mechanisms allowing survival of the genome HBoV in the infected cell. 5. The immune response to infection of HBoV. 6. Laboratory diagnostic HBoV infections. 7. Bocaviruses and co-infections. 8. Summary

Słowa kluczowe: bokawirusy, koinfekcje, zakażenie przetrwałe

Key words: *Bocaviruses*, co-infections, persistent infection

1. Wstęp

W ostatnich latach opisano szereg nowych czynników wirusowych zakażeń dróg oddechowych. Jednym spośród nich jest bokawirus człowieka (*Human Bocavirus*, HBoV). Został on odkryty w 2005 r. w ramach projektu poszukiwania nowych czynników wywołujących zakażenia dróg oddechowych u dzieci. Narzędziem umożliwiającym jego wykrycie było zastosowanie metody nieswoistych starterów, tzw. Random PCR. Sekwencje uzyskanych produktów amplifikacji porównywano do znanych sekwencji bakteryjnych i wirusowych patogenów stwierdzając wysoki stopień ich podobieństwa do sekwencji genomu dwóch wirusów: *Bovine Parvovirus* (wirus bydła, BPV) i *Canine Minute Virus* (wirus psów, MVC) należących do rodziny *Parvoviridae* [5]. Ze względu na podobieństwa genetyczne oraz strukturalne, nazwę nowo odkrytego wirusa wyprowadzono od pierwszych członów obu wirusów [2]. Obecnie HBoV uznawany jest za jeden z ważniejszych

czynników wirusowych zakażeń układu oddechowego u dzieci poniżej 5 roku życia. Obecnie opisano 4 typy HBoV: 1, 2, 3 i 4 [9].

2. Epidemiologia zakażeń HBoV

Występowanie zakażeń HBoV

Począwszy od 2005 r. na całym świecie poszukuje się zakażeń bokawirusami. Wykryto je m.in. w Australii, Północnej Ameryce, Europie (w tym w Polsce), Azji i Afryce [42, 35]. Sezonowość występowania HBoV różni się w zależności od regionu geograficznego. We Francji, Niemczech, Szwecji, USA oraz Polsce [29] zakażenia HBoV najczęściej stwierdza się w miesiącach zimowych oraz wczesną wiosną [9]. Natomiast w Japonii i Korei – późną wiosną i początkiem lata (Tab. I). Rozpowszechnienie poszczególnych genotypów HBoV na świecie jest podobne, a ze względu na częste rekombinacje pomiędzy nimi, możliwe jest pojawienie się kolejnego typu [25, 35].

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel/fax +48 22 54 21 385; e-mail: eabramczuk@pzh.gov.pl

Zakażenia bokawirusami stanowią do 33% wirusowych zakażeń układu oddechowego [16, 25]. Różnice w obserwowanej częstości zakażeń mogą wynikać z charakterystyki badanych grup pacjentów: wieku oraz ciężkości zakażenia. Większość przedstawianych badań dotyczy dzieci poniżej 5 r.ż. Informacje odnośnie zakażeń HBoV w innych grupach wiekowych są nieliczne a ponadto zakażenia te najczęściej wykrywano u osób hospitalizowanych. Obecnie zakażeń tych poszukuje się także u chorych leczonych ambulatoryjnie lub w domu [15].

Niektórzy autorzy wskazują, że częstość zakażeń dróg oddechowych wywołanych przez HBoV wśród chorych nie wymagających hospitalizacji jest wyższa niż wśród pacjentów hospitalizowanych [15, 28]. Najwyższy (dotychczas) odsetek chorych z zakażeniem HBoV1 stwierdzono w USA wśród najmłodszych dzieci (0–2 lata) uczęszczających do żłobka (33%). Wyniki naszego zespołu zdają się potwierdzać tezę o udziale HBoV1 przede wszystkim w zakażeniach o lżejszym przebiegu – stwierdzono bowiem znamiennej związek HBoV1 z zapaleniem oskrzeli lub zachorowaniem grypopodobnym, a nie z zapaleniem płuc lub oskrzelików [29]. Jednak wśród dzieci hospitalizowanych, szczególnie z powodu ostrego zakażenia dolnych dróg oddechowych (bronchiolitis, zapalenie płuc), częstość zakażeń HBoV1 może być wysoka. W Arabii Saudyjskiej w okresie I–IV 2012 r. udział HBoV1 w tych zakażeniach sięgał 22,5% a w Argentynie w latach 2007–2009 wyniósł 21,5% [1].

Większość prac badawczych wskazuje na spadek częstości zakażeń HBoV1 wraz z wiekiem pacjentów [4, 26]. Jednakże w Argentynie, w 2010 r. podczas badania osób dorosłych hospitalizowanych z powodu ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, aż u 22,7% pacjentów potwierdzono zakażenie bokawirusami, czyli porównywalnie do częstości obserwowanych u dzieci (21,5%).

Analiza rozkładu płci wśród chorujących wskazuje na nieznamiennej wyższą częstość zakażeń bokawirusami u chłopców. Może wiązać się to z faktem, że podobnie jak w zakażeniach wywołanych przez RSV, chłopcy częściej wymagają hospitalizacji [6].

Bokawirusy mogą być czynnikiem etiologicznym zarówno zakażeń dróg oddechowych, jak też układu pokarmowego. W zakażeniach układu pokarmowego stwierdza się obecność DNA wszystkich typów HBoV, jednak najczęściej wykrywane jest DNA HBoV2 (21%). Stwierdzona w niektórych badaniach wysoka częstość wykrywania w kale HBoV1 w przypadkach z objawami ze strony układu pokarmowego (nawet 17%) może wynikać z rozszerzenia się zakażenia dróg oddechowych na drogi pokarmowe. Natomiast HBoV typu 3 i 4 wykrywane są wyłącznie w zakażeniach dróg pokarmowych i występują znacznie rzadziej niż HBoV 2 i 1 [18].

Transmisja

DNA bokawirusów wykrywano w wydzielinach dróg oddechowych, w moczu i w kale. W związku z tym uważa się, że do zakażenia tymi wirusami może dojść przez bezpośredni kontakt z chorą osobą, drogą kropelkową jak również przez styczność ze skażonymi wirusem powierzchniami [15, 37]. W odróżnieniu od spokrewnionych wirusów BPV i MVC powodujących zakażenia ogólnoustrojowe i wewnątrzmaciczne, badania płynu owodniowego zakażonych HBoV kobiet ciężarnych nie potwierdziły obecności w nim wirusa [2].

Chorobotwórczość

Bokawirus człowieka opisany został po raz pierwszy w 2005 r., i przez wiele lat część badaczy zastanawiała się, czy jest on dla człowieka czynnikiem chorobotwórczym czy tylko przypadkowym „Pasażerem” [37]. Nie stwierdzano istotnych różnic w koncentracji wirusa lub ekspresji białek pomiędzy ciężkimi zakażeniami dolnych i lekkimi zakażeniami górnych dróg oddechowych [37]. Szczególne wątpliwości budził fakt, że w przypadku koinfekcji z innymi wirusami, koncentracja bokawirusa w badanym materiale była wyższa niż w przypadku zakażeń wywołanych jedynie przez HBoV [5]. Wykrycie materiału genetycznego HBoV1 u dzieci z objawami zakażeń dróg oddechowych, u których nie udało się znaleźć innego czynnika zakaźnego potwierdza, że ludzki bokawirus, po parwowirusie B19 oraz parwowirusie 4, może być uznany jako kolejny członek rodziny *Parvoviridae* patogenny dla człowieka [2, 5]. Doniesienia wskazujące na udział białka NP1 HBoV1 w apoptozie komórki sugerują potencjalnie patogenny charakter tego wirusa.

Objawy

W przypadku zakażeń oddechowych, w zależności od typu HBoV, obserwuje się zróżnicowany przebieg choroby poczynając od bezobjawowego przez łagodne aż do ciężkich objawów ze strony układu oddechowego [15, 25]. Zakażenia układu oddechowego najczęściej wywoływane są przez HBoV1, sporadycznie HBoV2. Objawy zakażenia HBoV1 są podobne do obserwowanych w innych zakażeniach oddechowych zarówno wirusowych jak i bakteryjnych. Najczęściej towarzyszą im: kaszel, katar, gorączka, ból gardła, trudności w oddychaniu, zapalenie spojówek, rumień, wysypka, a także nudności, wymioty lub biegunka. HBoV1 mogą również być przyczyną chorób o znacznie cięższym przebiegu, takich jak: zapalenie płuc, oskrzelików, oskrzeli oraz krupę wirusowego [6, 15, 37]. U dzieci poniżej 2 r.ż. szczególnego znaczenia nabiera różnicowanie zakażeń HBoV i RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) z powodu możliwości wystąpienia powikłań po zakażeniach RSV. W naszej części świata, infekcje HBoV i RSV często występują w podobnym sezonie

– jesienno-zimowym (Tab. I). Według niektórych, cechą różniącą może być krótszy okres inkubacji zakażenia wywołanego przez bokawirusy, który wynosi 3–4 vs. 4–5 dni dla RSV. Inni autorzy wskazują, iż jedynym objawem klinicznym odróżniającym te zakażenia jest znacznie częstsze występowanie w czasie infekcji HBoV niedotlenienia oraz neutrofilii [41].

Główną przyczyną zakażeń pokarmowych są bokawirusy typu 2, typu 3 i typu 4 [15, 22, 25]. Za istotny czynnik etiologiczny chorób układu pokarmowego uznawany jest HBoV2 [10, 15, 17, 18], ponieważ jak wskazują niektórzy autorzy, HBoV2 jest trzecim, po rotawirusach i astrowirusach, wirusem wywołujących ostre zapalenie żołądka i jelit u dzieci [3] (Tab. I).

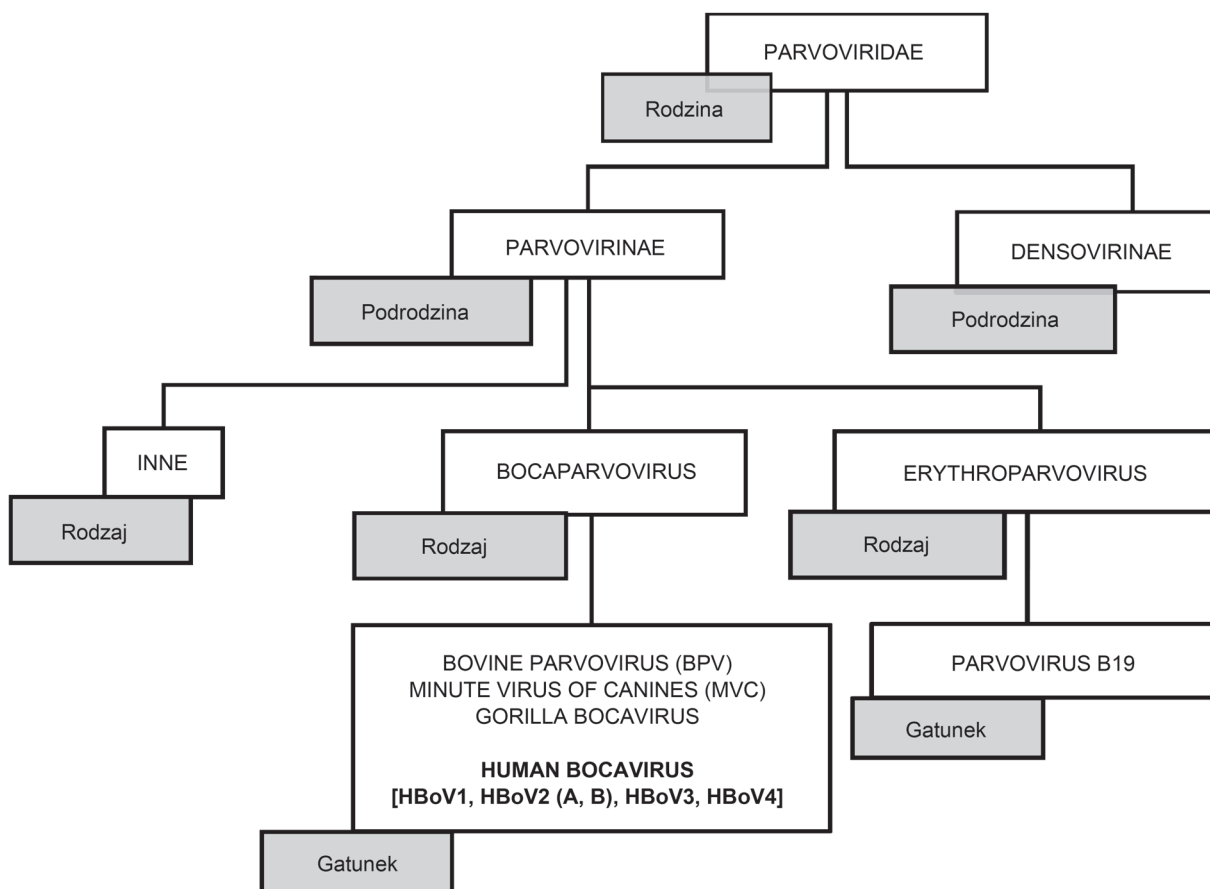
Podobnie jak w przypadku innych patogenów, znacznie częściej zakażenia bokawirusami występują u osób przewlekle chorych, u wcześniaków, dzieci, których matki paliły papierosy w okresie ciąży, osób z predyspozycją do astmy, poddanych leczeniu immunosupresyjnemu (np. osób po przeszczepie), dzieci przebywających w żłobkach, przedszkolach. Mimo, iż zakażenia obserwowane są głównie u małych dzieci, to materiał genetyczny HBoV2 wykrywany był również u osób dorosłych, w tym u pacjentów w wieku powyżej 65 lat [21].

Stwierdzono, że u osób z obniżoną odpornością zakażenia HBoV często przekształcają się w formę przetrwałego zakażenia [25, 35]. Uważa się, że takie

Tabela I
Wybrane badania występowania HBoV w zakażeniach dróg oddechowych i pokarmowych

Kraj/lata badań [Ref]	Liczba badanych/wiek	HBoV N+/%	Koinfekcje %/ z jakimi wirusami	Genotyp HBoV	Sezon zakażeń	Objawy
Holandia 2005–2006 [27]	257/śr. 1,6 lat	4/1,5	75/AdV, RSV, HMPV	HBoV	XI–I	gorączka, katar, kaszel, duszność, wysypka
Francja 2003–2004 [9]	589/śr. 1,3 lat	26/4,4	35/RSV, HMPV, AdV	HBoV	XII–VI	duszność, niewydolność krążenia, kaszel, gorączka, zapalenie oskrzelików
Chiny 2005–2006 [32]	252/2–36 m-cy	21/8,3	9,5/HCoV-229E	HBoV	XI–IV	kaszel, gorączka, świszczący oddech, wymioty
Hiszpania 2006–2008 [28]	1189/śr. 2 lata	177/12,6	81/RSV, IFV, HMPV	HBoV	XI–II	zakażenie dolnych i górnych dróg oddechowych
Japonia 2007–2009 [24]	402/śr. 14 m-cy	34/8,5	41/ PIV, HRV, HMPV, AdV, RSV	HBoV	III–IX	kaszel, gorączka (>38,9°C), świszczący oddech, biegunka, hipoksja
Polska 2009–2011 [29]	257/<5 lat	13/6	3,1/RSV, CMV, EV	HBoV	I–II	ostre zakażenia górnych dróg oddechowych, bronchitis, pneumonia, bronchiolitis
Arabia Saudyjska I–V.2012 [1]	80/5 m–10 lat	18/22,5	94/ RSV, IFV, AdV	HBoV1	bd	ostre zakażenia górnych dróg oddechowych, grypodobne, biegunka
Chile 1985–2010 [22]	462/<5 lat	89/19,3	bd	HBoV1 (14,1%) HBoV2 (3,9%) HBoV3(1,3%) HBoV4 (0)	bd	ostre zapalenie żołądka i jelit
USA 2007–2008 [4]	151/<18 lat	5/3,3	bd	HBoV1–(3,3%) HBoV2–(0,7%) HBoV3–0	XII–II	biegunka, ból brzucha, kaszel
	328/>18 lat	10/3	bd	HBoV1–(1,5%) HBoV2–(1,5%) HBoV3–(0)	XII–II	biegunka, ból brzucha, kaszel
Niemcy [39]	835/śr. 1,8 lat	87/10,3	39,1/ RSV, IFV t. A, AdV	HBoV	cały rok, najwięcej zimą	ostre zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych
Szwecja 2003–2004 [2]	540/małe dzieci	17/3,1	82/IFV t. A, RSV	HBoV	cały rok, najwięcej zimą	ostre zakażenia dolnych dróg oddechowych
Szwajcaria [33]	112/<3 m-ce	5/4,5	80/bd	HBoV	bd	zakażenia dróg oddechowych
Wlk. Brytania 2005–2006 [26]	574/6–24 m-ce	47/8,2	43/ RSV, AdV	HBoV	XII–I	ostre zakażenia dolnych dróg oddechowych

N + – liczba pacjentów, u których stwierdzono zakażenie HBoV; bd – brak danych; śr. – średni wiek; AdV – adenowirusy; RSV – Respiratory Syncytial virus; HCoV – koronawirusy; CMV – cytomegalowirus; HMPV – metapneumowirus człowieka; IFV – wirus grypy; EV – enterowirusy



Rys. 1. Schemat taksonomii bokawirusów (opracowanie własne)

przetrwale zakażenie może mieć wpływ na zaostrzenie chorób podstawowych.

Leczenie w przypadku zakażeń HBoV jest zwykle objawowe. Nie znana jest skuteczność leków antywirusowych, nie stwierdzono także efektu terapeutycznego w wyniku podawania kortykosteroidów [25, 35].

3. Charakterystyka bokawirusów człowieka

Systematyka

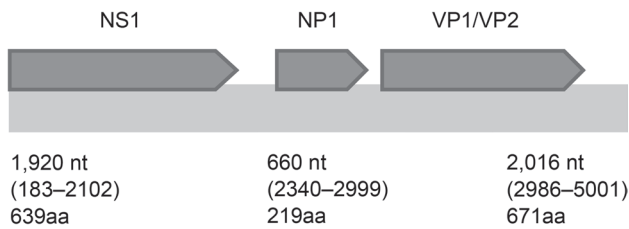
Do rodziny *Parvoviridae* zaliczane są wirusy chorobotwórcze dla bezkręgowców (podrodzina *Densovirinae*) oraz kręgowców (podrodzina *Parvovirinae*). W obrębie podrodziny *Parvovirinae* wyróżniono 8 rodzajów: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus* oraz *Erythroparvovirus*. Wykryte do tej pory wirusy chorobotwórcze dla człowieka zakwalifikowane są do dwóch rodzajów: *Erythroparvovirus* – parwowirus B19 oraz *Bocaparvovirus*, które zostały wyodrębnione w latach 2009–2010 – HBoV1, HBoV2, HBoV3 i HBoV4. W obrębie HBoV2 wydzielono również dwa warianty: A i B. Do rodzaju *Bocaparvovirus* należy również wirus zakażający bydło – *Bovin Parvovirus* (BPV), wirusy patogenne

dla psów – *Canine Minute Virus* (MVC) oraz mały – *Gorilla Bocavirus* (Rys. 1) [12, 15]. Wirusy o wysokim stopniu podobieństwa do HBoV wykryto u goryli i świń. Wskazuje to na prawdopodobne odzwiercące pochodzenie wirusów zakażających człowieka. Mimo to, przypuszcza się, że rezerwuarem HBoV może być tylko człowiek [7, 20].

Struktura

Parwowirusy są to najmniejsze znane wirusy DNA – *parvus* oznacza mały. Kapsyd tych wirusów jest dwudziestościanem zbudowanym z 12 pentamerycznych kapsomerów czyli łącznie 60 podjednostek zbudowanych z różnych białek (VP1-VP6), ma wielkość 20 nm i jest pozbawiony osłonki. Genom wirusa stanowi jednoniciowe DNA o wielkości 5,217–5,299 nukleotydów zawierające powtórzone sekwencje terminalne o długości 32–52 pz.

Organizacja genomu HBoV przypomina budowę genomu wirusów BPV i MVC (Rys. 2). Podobnie jak u wszystkich wirusów należących do podrodziny *Parvovirinae*, w genomie wyróżnia się 2 otwarte ramki odczytu (Open Reading Frame-ORF) kodujące odpowiednio: niestrukturalne białko NS1 (na końcu 5') oraz białka kapsydu VP1 i VP2 (na końcu 3') [25]. Najmniejszą podjednostką kapsydu jest VP1, które prawdopodobnie



Rys. 2. Schemat organizacji genomu bokawirusów (opracowanie własne)

odgrywa istotną rolę w tropizmie tkankowym oraz w patogenezie [20]. Koniec N^o białka VP1 zawiera fragment fosfolipazy A2 (PLA2), która jest niezbędna w procesie zakażenia [5, 10]. W przypadku HBoV sekwencja tego regionu jest w 43% identyczna z sekwencją występującą w genomie MVC oraz w 42% z sekwencją BPV. Uważa się, że białko NS-1, które bierze udział w transkrypcji i ulega ekspresji podczas replikacji może stanowić istotny wskaźnik zakażenia bokawirusami. Cechą charakterystyczną dla bokawirusów człowieka jest dodatkowa, trzecia, otwarta ramka odczytu (tzw. mid-ORF). Fragment ten koduje niestrukturalne białko NP-1 o wielkości 26 kDa, wykazujące 47% homologii sekwencji aminokwasowej z białkiem NP-1 wirusów MVC i BPV. Dla wirusów z rodzaju *Bocaparvovirus* region ten jest wyjątkowo konserwatywny [25]. Funkcja białka NP-1 nie została jeszcze w pełni poznana, niektóre badania sugerują udział białka NP-1 HBoV1 w wieloetapowym procesie apoptozy [38].

Wszystkie geny bokawirusów przepisywane są z jednego promotora, zlokalizowanego w pobliżu końca 5' genomu. Sekwencja terminalna, która odgrywa bardzo ważną rolę w procesie inicjacji replikacji, wykazuje istotną homologię do odpowiedników u wirusów MVC i BPV [23]. Spośród wszystkich parwowirusów sekwencje tworzące otwarte ramki odczytu u bokawirusów zajmują największą powierzchnię genomu.

Rozwój metod biologii molekularnej umożliwił poznanie różnic w sekwencji otwartych ramek odczytu poszczególnych typów bokawirusów [21]. Uznaje się, że różnice powyżej 8% w sekwencji białkowej i powyżej 10% w sekwencji nukleotydowej białka VP1 są wystarczające do wyodrębnienia nowego gatunku. Z kolei różnice powyżej 1,5% i 5% odpowiednio w sekwencji białkowej i nukleotydowej tego samego genu mogą pozwolić na wyróżnienie nowego genotypu. W latach 2009–2010 w obrębie HBoV wyodrębniono genotypy: HBoV1, HBoV2 (warianty A i B), HBoV3 i HBoV4 [19]. Uważa się, że pierwotnie występowały enteropatogenne bokawirusy HBoV2 i 4, następnie wyewoluował HBoV1, natomiast najmłodszy HBoV3 powstał na drodze rekombinacji HBoV1 i HBoV4 [25]. Organizacja genomu HBoV2 i HBoV3 jest identyczna jak w przypadku HBoV1, jednak sekwencje kodujące białka NS1, NP1 oraz VP wykazują pewną zmienność

i są one homologiczne odpowiednio w 80%, 90% oraz 70% dla HBoV2 oraz 80%, 80% oraz 80% – dla HBoV3. Analiza sekwencji białka VP2 poszczególnych genotypów HBoV wykazała wysoki stopień podobieństwa pomiędzy nimi [10].

Replikacja

Uważa się, że replikacja HBoV zachodzi, podobnie jak w przypadku innych parwowirusów, poprzez mechanizm „toczącego się koła” [25]. Pierwszy etap replikacji parwowirusów – wytworzenie pośredniej dwuliniowej nici DNA zachodzi z wykorzystaniem białek gospodarza. Charakterystyczna dla parwowirusów grupa 3'OH na końcu sekwencji palindromowej wykorzystywana jest przez wirusy jako starter w procesie ich replikacji. W wyniku tej reakcji powstaje dwuniciowa forma DNA zakończona strukturą szpilki do włosów. Struktura ta jest konieczna do dalszej transkrypcji, w tym niezbędnego do dalszych etapów replikacji białka NS-1. Białko to, przyłączając się w miejscu „Ori” w genomie parwowirusów przecina nic w miejscu pierwotnie występujących sekwencji palindromowych, odtwarzając strukturę jednoliniową DNA. W efekcie, sekwencja tworząca strukturę spinki do włosów zostaje przeniesiona z nici rodzicielskiej na nic potomną. Razem z 18–26 nukleotydową sekwencją białko NS1 zostaje kowalencyjnie przyłączone do wolnego końca 5' nici [25, 30, 35]. W badaniach wykorzystujących plazmid zawierający genom HBoV wykazano, że podczas zakażenia ekspresji ulegają dwa typy białka NS1. Pierwsze, o długości 639 aa jest znacznie krótsze od białka NS1 występującego u BPV i MVC i nie wykazuje z nimi homologii na końcu C'. Drugie, większe białko NS1 (długość 781aa) jest homologiczne do końca C' białka NS1 występującego u MVC i BPV. Sekwencja C-terminalna białka NS-1 jest fragmentem konserwatywnym, występującym u wszystkich genotypów bokawirusów [34].

4. Mechanizmy umożliwiające przetrwanie genomu HBoV w zakażonej komórce

Jednym z rozważanych mechanizmów może być powstawanie episomalnych form genomu. Istnieje sugestia, że forma episomalna może być latentną formą zakażenia, która w momencie koinfekcji innym wirusem ulega reaktywacji [2]. Początkowo formę tę zidentyfikowano jedynie u HBoV1, jednak dalsze badania wykazały, że występuje ona również u pacjentów zakażonych HBoV3 [19]. Istnienie takiej formy genomu wirusa może tłumaczyć fakt wykrywania przez dłuższy okres (od 3 tygodni do 6 miesięcy) materiału genetycznego bokawirusów u osób bez objawów zakażenia, zarówno w materiale z dróg oddechowych

(HBoV1), jak i w próbkach kału (HBoV1-3) [15, 19, 33]. Zarówno forma episomalna, jak i liniowy kwas nukleinowy HBoV zostały wykryte w tkankach nowotworowych, w tym u osób z nowotworem płuc i jelita grubego. Wysznięto hipotezę, że HBoV, podobnie jak wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), może przebywać w formie episomalnej w tkankach organizmu ludzkiego i prowadzić do ich uszkodzenia [36].

Niektórzy autorzy wysuwają tezę, że sposób replikacji HBoV genotypu 1 różni się od mechanizmu replikacji innych parwowirusów [26]. Być może dalsze badania nad cyklem replikacji pozwolą zrozumieć mechanizm patogenności tych wirusów i zróżnicowania miejsca docelowego. Mimo, iż parwowirus B19 oraz bokawirusy są patogenami należącymi do jednej rodziny, występują między nimi istotne różnice. Parwowirus B19 wykazuje tropizm do szpiku kostnego i mięśnia sercowego u ludzi. Natomiast bokawirusy zaliczane do genotypu 1 wykazują tropizm do układu oddechowego człowieka i wykrywano je głównie w nabłonku dróg oddechowych. Podczas zakażenia HBoV1 dochodzi prawdopodobnie do wirerii i możliwe jest wykrycie DNA tego wirusa we krwi. Do tej pory nie wyjaśniono, czy wykrycie w 2012 r. DNA HBoV1 w płynie mózgowo-rdzeniowym u dziecka z zapaleniem mózgu było wynikiem wirerii czy też innych mechanizmów [23]. W badaniach *in vitro* obserwowano namnażanie się HBoV1 poza nabłonkiem dróg oddechowych – w nabłonku jelit oraz w tkankach limfatycznych [5], a obecność tych wirusów stwierdzano (z częstością 1,5–19%) także w próbkach kału pobranego od ludzi, zarówno w Australii, Ameryce Północnej, Azji, Europie jak i w Afryce [21].

Wirusy HBoV należące do genotypów 2,3 i 4 wykrywano przede wszystkim w próbkach kału pobranych od osób chorych z objawami zakażeniem układu pokarmowego, co może wskazywać, że te wirusy mogą replikować się w układzie pokarmowym [10, 17, 15]. W przeciwieństwie do HBoV1, dotychczas nie wykryto materiału genetycznego wirusów HBoV 2–4 w próbkach krwi [35]. W 2009 r. z próbki kału pobranej od dziecka z ostrym porażeniem wiotkim (AFP) wyizolowano wirusa, który wykazywał wysokie podobieństwo do HBoV2 [17]. Częstość występowania HBoV2 u dzieci z porażeniem wiotkim wynosi ok. 5% i jest zbliżona do częstości wykrywania HBoV2 u dzieci zdrowych, co wskazuje na brak związku tego wirusa z AFP [17].

5. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie HBoV

Zakażenia bokawirusami człowieka obserwowane są głównie u dzieci między 6 miesiącem a 3 rokiem życia. Niewielka liczba tych zakażeń u dzieci <6 mie-

siąca życia tłumaczona jest ochronną rolą przeciwciał biernie otrzymanych od matki. Występujące u noworodków zakażenia bokawirusami najprawdopodobniej są wynikiem infekcji przebytej w czasie życia płodowego, najczęściej w trzecim trymestrze ciąży [10, 16, 37]. Z kolei Jartii i wsp. [15] twierdzą, że matczyne przeciwciała przeciwko HBoV najlepiej chronią dzieci jedynie do 2 miesiąca życia i po tym okresie ich poziom się obniża. Wraz ze spadkiem matczynych przeciwciał rośnie u dzieci liczba zakażeń, co powoduje u nich wzrost poziomu przeciwciał osiągając najwyższe miana ok. 6–7 roku życia. Ogólnie uważa się, że większość dzieci do 5 roku życia, oraz prawie 100% osób dorosłych, posiada przeciwciała przeciwko HBoV.

W badaniach *in vitro* wykazano, że zakażenie HBoV1 wywołuje typową, również dla innych wirusów, odpowiedź immunologiczną. W przypadku HBoV1 wykazano, że większość przeciwciał skierowanych jest przeciwko obu białkom kapsydu (VP1/VP2) [10, 25, 15]. Stwierdzono również, że w przeciwieństwie do parwowirusa B19 u bokawirusów białko VP2 posiada wyższą immunoreaktywność niż VP1, co może wynikać z różnicy w lokalizacji białek VP1 i VP2 w kapsydie obu wirusów [16]. Na podstawie częstości wykrywania u pacjentów przeciwciał dla poszczególnych typów HBoV można stwierdzić, iż najczęściej występują zakażenia HBoV1, a rzadziej HBoV2, HBoV3 i HBoV4 [34]. U osób zakażonych bokawirusami oprócz syntezy swoistych przeciwciał obserwuje się również wzrost poziomu IL-3, interferonu-gamma, IL-10 oraz TNF-alfa [15].

6. Laboratoryjna diagnostyka zakażeń bokawirusami

Do 2009 roku diagnostyka zakażeń bokawirusem oparta była przede wszystkim o molekularne badania próbek klinicznych. Udaną próbę namnażania bokawirusa podjęli Dijkman i wsp. tworząc w 2009 r. sztuczną linię komórkową, która morfologicznie i funkcjonalnie odpowiada ludzkiej tkance dróg oddechowych (modyfikacja linii KTEpC) [8].

Potwierdzeniem replikacji wirusów był wzrost liczby kopii DNA HBoV w zawiesinie określony techniką ilościowego PCR. Autorzy wykazali także, że uzyskana hodowla może posłużyć do namnażania i charakteryzowania nowych wirusów zakażających układ oddechowy. W 2012 roku Huang i wsp. [11] wykazali, że konstrukt zawierający DNA HBoV1 namnaża się w ludzkich komórkach embrionalnych nerki (HEK293).

Ze względu na trudności związane z namnażaniem się bokawirusów w hodowlach komórkowych w diagnostyce tych zakażeń nie stosuje się metody izolacji wirusa. Dostyc krótki okres wylęgania powoduje, że w momencie wystąpienia objawów chorobowych nie

stwierdza się odpowiedzi humoralnej. Tym samym metodą z wyboru są ilościowe techniki wykrywania genomu HBoV. Dotychczas stosowane techniki molekularne wykorzystywały fragmenty genomu kodujące białka NP1, NS1, VP1 oraz VP2 [42]. Najbardziej konserwatywnym fragmentem w genomie bokawirusów jest fragment kodujący niestrukturalne białko NP-1 i wykrycie tego genu, jak również genu białka NS-1 stanowią podstawową metodę diagnozowania zakażeń HBoV. W związku z możliwością przetrwania w zakażonych komórkach formy episomalnej DNA wirusa uważa się, że należy stosować techniki PCR umożliwiające określenie liczby kopii genomu wirusa. Za graniczne, diagnostyczne dla zakażeń dróg oddechowych wywołanych przez HBoV1, uważa się wykrycie w 1 ml badanej próbki $> 10^4$ kopii DNA (gc) [15, 16].

Próbki kliniczne najbardziej przydatne w badaniach molekularnych stanowią wymazy z nosogardzieli, ślina, surowica, mocz oraz kał [15, 31, 42].

Potwierdzeniem przebiegu zakażenia bokawirusami może być wykazanie w surowicy obecności przeciwciał w klasie IgM lub znaczącego przyrostu przeciwciał w klasie IgG [32]. Ze względu na obecność przeciwciał matczyńskich, jak również niedojrzałość układu immunologicznego we wczesnym okresie życia, kiedy najczęściej dochodzi do pierwotnego zakażenia HBoV, badania serologiczne nie są wykorzystywane w diagnostyce tych zakażeń. Ponadto krótki okres wylegania tej choroby powoduje, że wynik oznaczeń serologicznych wskazujących na infekcję HBoV uzyskuje się w okresie dość odległym od momentu zakażenia. Z tej przyczyny badania te przydatne są przede wszystkim dla celów epidemiologii. W czasie wzmacniania odpowiedzi humoralnej należy także uwzględnić fakt występowania reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciwko białkom kapsydu różnych typów HBoV. Metodą pozwalającą na odróżnienie wczesnego zakażenia HBoV od reinfekcji jest poszukiwanie przeciwciał przeciwko białkom strukturalnym VP1 i VP2 wirusów techniką Western blot immunofluorescencji lub ELISA.

7. Bokawirusy a zakażenia mieszane

Bokawirusy człowieka bardzo często występują w zakażeniach mieszanych z innymi wirusami. Zjawisko to dotyczy do 82% zakażeń oddechowych oraz do 100% zakażeń pokarmowych (Tab. I) [2]. Wykazano również, iż poziom wirēmii bokawirusami jest niższy w przypadku zakażeń mieszanych [43]. W zakażeniach pokarmowych często obserwuje się koinfekcje HBoV z norowirusami, rotawirusami, astrowirusami. W zakażeniach dróg oddechowych najczęściej są to współzakażenia z RSV, wirusami grypy, HMPV

(*Human Metapneumovirus*), RV (*Rhinovirus*) [25, 43]. W badaniach naszego zespołu stwierdzono 80% odsetek koinfekcji bokawirusa z innymi patogenami. Były to współzakażenia HBoV z RSV, EV (*Enterovirus*) i wirusem cytomegalii [29]. Ze względu na występowanie w podobnym okresie sezonowego wzrostu zachorowań dróg oddechowych wywołanych przez HBoV1 oraz RSV, opisywany udział współzakażeń HBoV1 z RSV jest często bardzo wysoki i wynosi nawet $> 50\%$. Może to mieć szczególne znaczenie dla dzieci poniżej drugiego roku życia, u których zakażenia RSV mają charakter ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, a zakażenie HBoV1 może pogorszyć rokowania dla pacjenta.

W dalszym ciągu trwają jednak dyskusje, czy tak wysoki udział HBoV w zakażeniach mieszanych jest wynikiem pokrywania się aktywności poszczególnych wirusów w tych samych porach roku i wynikających z tego nadkażeń, czy też wykrywania zakażeń bezobjawowych lub reaktywacji HBoV. Określana w różnych badaniach częstość występowania HBoV w asymptomatycznych zakażeniach różni się znacznie i wynosi od 0 do 40%.

8. Podsumowanie

Bokawirusy człowieka, po raz pierwszy opisane 10 lat temu, wywołują zakażenia, których głównymi objawami są kaszel, katar, ból gardła, trudności w oddychaniu, ale także nudności, wymioty i biegunka. Objawy takie są niespecyficzne i mogą być powodowane przez wiele innych patogenów np. koronawirusy, enterowirusy. Bokawirusy mogą także powodować zachorowania o ciężkim przebiegu np.: zapalenie oskrzelików płucnych, zapalenie płuc lub zapalenie żołądka i jelit u dzieci. Częstość zakażeń bokawirusami zależy od wielu czynników, nie wszystkie zostały do tej pory zbadane, jednak najczęściej wykrywane były u małych dzieci. Zgodnie z wynikami naszego zespołu, stanowią czynnik etiologiczny 6% wymagających hospitalizacji zakażeń oddechowych u małych dzieci. Udział bokawirusów znacznie wzrasta jeśli ocenie poddamy częstość zakażeń o lekkim lub asymptomatycznym przebiegu (nawet 40%). Jest to szczególnie istotne, jeśli weźmiemy pod uwagę często opisywane występowanie bokawirusów w zakażeniach mieszanych. Analiza danych w piśmiennictwie wskazuje na stosunkowo częste współzakażenia bokawirusów oraz RSV i HMPV. Jednak zjawisko to wymaga dalszych badań.

Występowanie zakażeń mieszanych może powodować istotne zaostrenie przebiegu zachorowania, przedłużenie czasu leczenia. Rozszerzona diagnostyka laboratoryjna zakażeń dróg oddechowych, uwzględniająca także bokawirusy, nie tylko pozwoli na zidentyfiko-

wanie czynnika etiologicznego zakażenia/zachorowania, ale także pozwoli na zastosowanie odpowiednich procedur zapobiegających szerzeniu się tych zakażeń. Należy bowiem podkreślić, że bokawirusy, podobnie jak enterowirusy, namnażają się m.in. w układzie pokarmowym, ponadto obecność genomu wirusa w próbkach klinicznych stwierdzano nawet po kilku tygodniach od ustąpienia objawów. Znaczenie biologiczne i epidemiologiczne tego zjawiska nie jest jeszcze do końca poznane, ale może ono wpływać na szerzenie się zakażeń bokawirusami.

Piśmiennictwo

- Abdel-Moneim A.S., Kamell M.M., Al-Ghamdi A.S., Al-Malky M.I.R.: Detection of Bocavirus in Children Suffering from Acute Respiratory Tract Infections in Saudi Arabia. *PLoS ONE*, **8**, e55500 (2013)
- Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B.: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12891–12896 (2005)
- Arthur J.L., Higgins G.D., Davidson G.P., Givney R.C., Ratcliff R.M.: A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathog.* **5**, e1000391 (2009)
- Bastien N., Brandt K., Dust K. i inni: Human Bocavirus infection Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 848–850 (2006)
- Bennett J.B., MBBCh, Pediatric Bocavirus website <http://emedicine.medscape.com/article/1355393-overview#showall>. 6 marzec 2014 r.
- Bi Z., Formenty P.B.H., Roth C.E.: Human bocavirus, a real respiratory tract pathogen. *Afr. J. Microbiol. Res.* 051–056 (2007)
- Cheng W., Li J., Huang C. i inni.: Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. *PLoS One*, **5**, e13583 (2010)
- Dijkman R., Koekkoek S.M., Molenkamp R., Schildgen O., Hoek L.: Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J. Virol.* **83**, 7739–7748 (2009)
- Foulongne V., Olejnik Y., Perez V., Elaerts S., Rodière M., Segondy M.: Human bocavirus in French children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1251–1253 (2006)
- Gurda B.L., Agbandje-McKenna M.: Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J. Virol.* **84**, 5880–5889 (2010)
- Huang Q., Qiu J.: Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog.* **8**, e1002899 (2012)
- ICTV website, http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=2013256 (14 listopada 2014 roku)
- Jacques J., Moret H., Renois F., Lévêque N., Motte J., Andréoletti: Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *J. Clin. Virol.* **43**, 142–147 (2008)
- Jang S.K., M.D., Chae S.L., Young K.K., M.D., Kap N.L., Chang K.L.: Human Bocavirus in Patients with Respiratory Tract Infection. *Korean J. Lab. Med.* **31**, 179–184 (2011)
- Jartti T., Hedman K., Jartti L., Ruuskanen O., Allander T., Söderlund-Venermo M.: Human bocavirus—the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* **22**, 46–64 (2012)
- Kantola K., Hedman L., Allander T., Jartti T., Lehtinen P., Ruuskanen O., Hedman K., Söderlund-Venermo M.: Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 540–546 (2008)
- Kapoor A., Delwar E.: A new bocavirus species in human stool. *J. Infect. Dis.* **199**, 196–200 (2009)
- Kapoor A., Delwart E.: Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent enteric infections. *J. Infect. Dis.* **201**(1), 1633–1643 (2010).
- Kapoor A., Hornig M., Asokan A., Williams B., Henriquez J.A., Lipkin W.I.: Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS ONE*, **6**, e21362 (2011)
- Kapoor A., Mehta N., Esper F. I.: Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS ONE*, **5**, e11948 (2010)
- Karalar L., Lindner J., Schimanski S., Kertai M., Seegerer H., Modrow S.: Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 633–639 (2009)
- Levican J., Navas E., Orizola J., Avendaño L.F., Gaggero A.: Human Bocavirus in Children with Acute Gastroenteritis, Chile, 1985–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1877–1880 (2013)
- Li J., Yang Y., Dong Y., Li Y., Huang Y., Yi K., Liu K., Li Y.: Key elements of the human bocavirus type 1 (HBoV1) promoter and its trans-activation by NS1 protein. *Virol. J.* **10**, 315 (2013)
- Ma X., Endo R., Ishiguro N., Ebihara T., Ishiko H., Ariga T., Kikuta H.: Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1132–1134 (2006)
- Malecki M., Schildgen V., Schildgen O.: Human bocavirus: still more questions than answers. *Future Virol.* **6**, 1107–1114 (2011)
- Manning A., Russell V., Eastick K., Leadbetter G.H., Hallam N., Templeton K., Simmonds P.: Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* **194**, 1283–1290 (2006)
- Monteny M., Niesters H.G.M., Moll H.A., Berger M.Y.: Human Bocavirus in Febrile Children. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 180–182 (2007)
- Pedrosa-Corral I., Pérez-Ruiz M., Navarro-Mari J.M., Ruiz-Bravo A.: Association of Human bocavirus with Respiratory Infections in Outpatients and in Patients Attended at a Reference Hospital. *Indian J. Virol.* **22**, 84–89 (2011)
- Pancer K.W., Gut W., Abramczuk E., Lipka B., Litwińska B.: Czynniki wirusowe ostrych zakażeń dróg oddechowych u małych dzieci. Wzrost zachorowań wywołanych przez metapneumowirusy podczas pandemii grypy 2009 w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **68**, 727–731 (2014)
- Piekarczyk A.: Podstawy wirusologii molekularnej, wyd. PWN, Warszawa, 2004, 425–426
- Pozo F., García-García M.L., Calvo C., Cuesta I., Pérez-Breña P., Casas I.: High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J. Clin. Virol.* **40**, 224–228 (2007)
- Qinfeng H., Qiu J.: Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human. *PLoS Pathog.* **8**, e1002899 (2012)
- Qu X.W., Duan Z.J., Qi Z.Y., Xie Z.P., Gao H.C., Liu W.P., Huang C.P., Peng F.W., Zheng L.S., Hou Y.D.: Human Bocavirus infection. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 165–168 (2007)
- Regamey N., Frey U., Deffernez C., Latzin P., Kaiser L.: Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**, 177–179 (2007)
- Schildgen O.: Human Bocavirus: Lessons Learned to Date. *Pathogens*, **2**, 1–12 (2013)
- Schildgen V., Malecki M., Tillmann R.L., Brockmann M., Schildgen O.: The Human Bocavirus Is Associated with Some Lung

- and Colorectal Cancers and Persist in Solid Tumors. *PLoS ONE*, **8**, e68020 (2013)
37. Schildgen O., Müller A., Allander T., Mackay I.M., Völz S., Kupfer B., Simon A.: Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 291–304 (2008)
 38. Sun B., Cai Y., Li Y., Li J., Liu K., Li Y., Yang Y.: The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induced cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells. *Virology*, **440**, 75–83 (2013)
 39. Vincente D., Cilla G., Montes M., Pérez-Trallero E.: Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 636–637 (2007)
 40. Weissbrich B., Neske F., Schubert J., Tollmann F., Blath K., Blessing K., Kreth H. W.: Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *Infect. Dis.* **6**, 109 (2006)
 41. Yoko M., Masaru T.: Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 1087–1092 (2010)
 42. Zaghoul M.Z.: Human bocavirus (HBoV) in children with respiratory tract infection by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and qualitative polymerase chain reaction (PCR). *Virology*, **19**, 239 (2011)
 43. Zhou L., Zheng S., Xiao Q., Ren L., Xie X., Luo J., Wang L., Huang A., Liu W., Liu E.: Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infect. Dis.* **14**, 424 (2014)