

Bocavírus humano em amostras fecais de neonatos hospitalizados em Belém, Pará

Human bocavirus in fecal samples of neonates hospitalized in Belém, Pará

Bocavirus humano en muestras fecales de recién nacidos hospitalizados en Belém, Pará

Recebido: 27/08/2022 | Revisado: 26/09/2022 | Aceitado: 30/12/2022 | Publicado: 02/01/2023

Karina Telma Loureiro de Araújo Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4768-5038>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: pskarinaeneto@hotmail.com

Patrícia dos Santos Lobo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0209-6969>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: patybiomed06@gmail.com

Delana Andreza Melo Bezerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3365-9368>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: delanabezerra@iec.gov.br

Edvaldo Tavares da Penha Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7162-684X>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: edvaldojunior@iec.gov.br

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8987-9781>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: joana.d.p.mascarenhas@gmail.com

Luana da Silva Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9509-4019>

Instituto Evandro Chagas, Brasil

E-mail: luanasoares@iec.gov.br

Resumo

A gastroenterite está entre as principais causas de morte em crianças menores de cinco anos em todo o mundo. Rotavírus, calicivírus, adenovírus entérico e astrovírus estão entre os principais agentes etiológicos virais envolvidos, entretanto, em aproximadamente 40% dos casos, o agente causador é desconhecido. Estudos recentes relataram o bocavírus humano (HBoV) como uma possível causa de gastroenterite aguda. Este estudo teve como objetivo investigar os genótipos do HBoV em amostras fecais de recém-nascidos internados em Belém do Pará em 2011. Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo, em que os dados foram analisados por PCR em tempo real. Em 100 amostras fecais de neonatos (crianças de 0 a 28 dias), o HBoV foi detectado em 20% das amostras, com maiores taxas de detecção no sexo feminino. Os maiores picos ocorreram em períodos com menores registros pluviométricos, sendo o genótipo HBoV1 o único detectado. A coinfeção foi identificada entre HBoV e rotavírus A em 10% dos casos. O presente estudo é pioneiro, pois relata a detecção desse agente viral exclusivamente em neonatos. Estudos adicionais serão necessários para elucidar o papel deste vírus em infecções gastrointestinais em crianças com idade inferior a 28 dias.

Palavras-chave: Bocavírus humano; Pacientes internados; Recém-nascido.

Abstract

Gastroenteritis is among the leading causes of death in children under five worldwide. Rotavirus, calicivirus, enteric adenovirus and astrovirus are among the main viral etiological agents involved, however, in approximately 40% of cases, the causative agent is unknown. Recent studies have reported human bocavirus (HBoV) as a possible cause of acute gastroenteritis. This study aimed to investigate the HBoV genotypes in fecal samples of newborns hospitalized in Belém do Pará in 2011. This is a cross-sectional, retrospective, descriptive study, in which data were analyzed by real-time PCR. In 100 fecal samples from neonates (children aged 0 to 28 days), HBoV was detected in 20% of the samples, with higher detection rates in females. The highest peaks occurred in periods with lower rainfall records, with the HBoV1 genotype being the only one detected. Co-infection was identified between HBoV and rotavirus A in 10% of cases. The present study is a pioneer, as it reports the detection of this viral agent exclusively in neonates. Additional studies will be needed to elucidate the role of this virus in gastrointestinal infections in children aged less than 28 days.

Keywords: Human bocavirus; Inpatients; Newborn.

Resumen

La gastroenteritis es una de las principales causas de muerte en niños menores de cinco años en todo el mundo. Rotavirus, calicivirus, adenovirus entéricos y astrovirus se encuentran entre los principales agentes etiológicos virales involucrados, sin embargo, en aproximadamente el 40% de los casos, se desconoce el agente causal. Estudios recientes han informado que el bocavirus humano (HBoV) es una posible causa de gastroenteritis aguda. Este estudio tuvo como objetivo investigar los genotipos de HBoV en muestras fecales de recién nacidos hospitalizados en Belém do Pará en 2011. Se trata de un estudio transversal, retrospectivo, descriptivo, en el que los datos fueron analizados por PCR en tiempo real. En 100 muestras fecales de neonatos (niños de 0 a 28 días de edad), se detectó HBoV en el 20% de las muestras, con tasas de detección más altas en mujeres. Los picos más altos ocurrieron en periodos con registros de menor precipitación, siendo el genotipo HBoV1 el único detectado. Se identificó coinfección entre HBoV y rotavirus A en el 10% de los casos. El presente estudio es pionero, pues reporta la detección de este agente viral exclusivamente en neonatos. Se necesitarán estudios adicionales para dilucidar el papel de este virus en las infecciones gastrointestinales en niños menores de 28 días.

Palabras clave: Bocavirus humano; Pacientes hospitalizados; Recién nacido.

1. Introdução

A gastroenterite aguda (GA) é uma doença tratável e evitável, contudo é a principal causa de desnutrição e a sexta principal causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade no mundo. As estimativas globais de mortalidade por diarreia em menores de 5 anos no ano de 2017 apontam que ocorreram cerca de 6 mil mortes por diarreia, sendo que aproximadamente 495 óbitos incidiram em crianças de 0 a 27 dias (WHO, 2018).

As taxas de mortalidade por diarreia no Brasil no ano de 2019, em crianças menores de 4 anos de idade, mostram que há maior vulnerabilidade em menores de 1 ano de idade, ocorrendo maior número de óbitos na região Nordeste, seguida das regiões Norte e Sudeste. De acordo com os dados das estatísticas vitais, no referido ano foram notificados no território nacional 13.356 mil internações hospitalares por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível em crianças menores de 1 ano e 273 óbitos. Das internações, 1.988 ocorreram no estado do Pará, sendo 503 referentes ao município de Belém, 21 óbitos no estado, com maior prevalência 42,85% na capital (Brasil, 2021).

A diarreia é definida como a ocorrência de 3 ou mais evacuações amolecidas ou líquidas no período de 24 horas e é classificada como: diarreia aguda aquosa, quando tem durabilidade de até 14 dias; disenteria, caracterizada pela presença de sangue nas fezes; e diarreia persistente, quando prevalece por mais de 14 dias (Morais et al., 2017). É uma das manifestações clínicas da GA, que é um termo utilizado quando diversos patógenos causam infecção no trato gastrointestinal (TGI), desencadeando alterações nas funções intestinais, e pode estar associada a náuseas, vômito e dor abdominal (Carvalho, Gabbay, Siqueira, Linhares, & Parente, 2014; Lima, R. M; Dias, 2010).

A GA é uma síndrome que tem como principais agentes etiológicos bactérias, parasitos e vírus, os quais geralmente são transmitidos de forma direta (de pessoa a pessoa, através das mãos contaminadas) ou de forma indireta (pela ingestão de água e alimentos contaminados ou contato com objetos contaminados) (Brasil, 2019). Os principais vírus envolvidos são: rotavírus, calicivírus, adenovírus entéricos e astrovírus, no entanto, em cerca de 40% dos casos não se conhece o agente etiológico envolvido, todavia estudos recentes têm relatado a associação do bocavírus humano (HBoV) como agente causador de GA (Campos et al., 2016; De et al., 2017; Khamrin et al., 2012; Lasure & Gopalkrishna, 2017).

O HBoV pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocaparvovirus*. É um parvovírus descrito pela primeira vez em 2005, sendo identificado em amostras do trato respiratório (TR) de crianças com doenças respiratórias (Allander et al., 2005). Apesar de sua identificação ser predominante em amostras respiratórias, também foi encontrado em amostras fecais de estudos realizados em diversas partes do mundo (Alam et al., 2015; Albuquerque et al., 2007; Arthur et al., 2009; Chhabra et al., 2013; La Rosa et al., 2016; Lasure & Gopalkrishna, 2017; Nora-Krukke et al., 2018; Paloniemi et al., 2014; Proenca-Modena et al., 2013; Vicente et al., 2007; Zhou et al., 2017).

O HBoV foi relatado como patógeno humano em 2005, entretanto a sua relação com a GA não é bem esclarecida

(Allander et al., 2005; Lasure & Gopalkrishna, 2017). No entanto, tem sido detectado com bastante frequência em paciente com esta doença, principalmente em crianças entre 6 a 24 meses, sugerindo que este vírus possa ser um agente etiológico de GA (Campos et al., 2016). Considerando-se que uma quantidade significativa de casos de Doenças Diarreicas Aguda (DDA) continua sem etiologia definida, estudos que investigam agentes patogênicos emergentes para GA, tal como HBoV, são de extrema relevância, pois dessa forma pode-se verificar a relação deste vírus com a GA e identificar o padrão de circulação do vírus. Além do mais, investigações de novos patógenos causadores de GA em crianças menores de 5 anos é extremamente importante, visto que mesmo após a introdução da vacina contra o rotavírus humano (RV) ainda existem muitos casos de doenças diarreicas.

2. Metodologia

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob parecer de número 3.987.053/2020, CAAE: 7003519.0.0000.0019. Foi dispensado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido visto que a presente pesquisa está vinculada a outro estudo visando a detecção e caracterização molecular de rotavírus A (RVA), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do IEC, sob parecer de número 0046/2011, CAAE: 0015.0.072.000-11.

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo. De acordo com Hochman, Nahas, Oliveira Filho, & Ferreira (2005), os estudos transversais analisam dados ou fenômenos que ocorreram ao longo de um determinado período e os casos são representados simplesmente pela presença do fator investigado. Ainda segundo os autores, estudos retrospectivos analisam fatos ou doenças que já ocorreram em um determinado período e quando descrevem a caracterização dos aspectos de da doença e sua distribuição no tempo apresentam perfil epidemiológico de estudo descritivo.

Esta pesquisa caracteriza-se como retrospectiva, visto que utilizou-se amostras fecais do Acervo Biológico da Seção de Virologia do IEC, as quais foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2011 por meio de uma vigilância para investigação de rotavírus em neonatos sem quadro diarreico, internados na ala de Neonatologia em um hospital referência na atenção à gestante de alto risco e ao recém-nascido. Estas amostras fecais foram armazenadas em freezer a -20°C para conservação e posteriormente enviadas para a Seção de Virologia, Laboratório de Rotavírus do IEC e foram testadas em outros estudos para investigação de RVA, astrovírus e norovírus (Hernandez et al., 2012; Neri, 2012).

Foram resguardados todos os procedimentos éticos, conforme a Resolução N°466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde (Brasil, 2012), e do total de 112 espécimes coletado foram utilizado somente 100 de acordo com os seguintes critérios: amostras fecais de neonatos (0-28 dias) que encontravam-se em quantidade suficiente para realização da suspensão fecal ou que já estavam na forma de suspensão fecal.

Após essa triagem as suspensões fecais foram preparadas a 10% em tampão Tris-Ca⁺ 0,01M pH 7,2 visando a extração do DNA viral. O genoma viral foi extraído conforme o método descrito por Boom et al. (1990), sendo utilizada água pura como controle negativo, amostras sabidamente positivas como controle positivo e adotadas medidas de controle para evitar contaminação das amostras durante todo o processo, como: realização dos procedimentos em Cabine de Segurança Biológica, higienização da cabine e das micropipetas com álcool etílico a 70% antes e após o uso e esterilizada por ação de luz UV (ultra violeta) por aproximadamente 15 minutos, abridor de microtubos, ponteiras estéreis com filtro, higienização das mãos e troca de luva sempre que necessário.

Para detecção do HBoV foi empregada a técnica de PCR em tempo real (qPCR) segundo o procedimento descrito por Ligozzi, Diani, Lissandrini, Mainardi, & Gibellini (2017), utilizando-se os seguintes iniciadores que detectam os quatro tipos de HBoV e amplificam um fragmento de 69 pares de bases do gene NS1: HBoV1F 5'-CTGCTGCACTTCCTGATTCAAT-3'

(93-114 nt); HBoV1R 5'-GGAGCTTCTTCCAGAGATGTTC-3' (139-161 nt); HBoV2/3/4F 5'-ATGCACTTCCGCATYTCGTC-3' (93-115 nt); HBoV2/3/4R: 5'-GGAGCTCTTYCCAGAGATGTTC-3' (139-161 nt) e HBoV-Sonda 5'-ACTGCATCCGGTCTC-3' (118-132 nt).

Tal procedimento ocorreu com a utilização dos seguintes reagentes: 20 µL de H₂O livre RNase/DNase q.s.p., 10 µL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2X), 0,5 µL de HBoV1F, HBoV1R, HBoV2/3/4F, HBoV2/3/4R (900 nM) (cada), 0,5 µL de HBoV-Sonda (250 nM) e 3 µL da amostra. Posteriormente essa mistura foi processada em sistema de detecção 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) nas seguintes condições: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos; 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 60 segundos, utilizando kit comercial GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X (Promega, USA). Amostras com valores Ct menores de 40 foram consideradas positivas, assim como no estudo de Ligozzi et al. (2017).

Para descrição dos genótipos os espécimes fecais, considerados positivos pela qPCR, foram testados pela PCR seguida de Nested-PCR visando a amplificação parcial do gene VP1, por meio da utilização dos seguintes iniciadores que detectam os quatro genótipos do HBoV e amplificam 612 e 576 pares de bases respectivamente, de acordo com o protocolo descrito por Kapoor et al. (2010): Pan-Boca F1-CGCCGTGGCTCCTGCTCT (267-284 nt); Pan-Boca R1-TGTTCCGCATCACAAAAGATGTG (856-878 nt) na primeira amplificação; Pan-Boca F2 -GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAAGAG (275-297 nt) e Pan-Boca R2 -CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTG TATGT (826-850 nt) na segunda amplificação.

Para realização da PCR foi realizada uma mistura com os seguintes reagentes: 3 µL de DNA, 1 µL de dNTP (10mM) (mistura dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,5 µL de Tampão 10X, 0,75 µL de MgCl₂ (50mM); 0,5 µL de Pan-Boca F1 (20µM); 0,5 µL de Pan-Boca R1 (20µM); 0,5 µL de TaQ DNA polimerase 5U/ µL e 16,25 µL de H₂O livre RNase/DNase q.s.p. Posteriormente, 3 µL do produto da extração foi adicionado a essa mistura e este material foi levado ao termociclador sob as seguintes condições: 10 ciclos de 95°C por 35 segundos; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos; 54°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos e finalizando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos (Kapoor et al., 2010).

Após esta etapa foi realizada uma Nested-PCR, onde 1 µL do DNA obtido na primeira amplificação foi adicionado a uma segunda mistura, com os seguintes reagentes, sob as mesmas condições empregadas na primeira amplificação: 1 µL de dNTP (10mM); 2,5 µL de Tampão 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50mM); 0,5 µL de Pan-Boca F1 (20µM); 0,5 µL de Pan-Boca R1 (20µM); 0,5 µL de TaQ DNA polimerase 5U/ µL e 18,25 µL de H₂O livre RNase/DNase q.s.p.

Após foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 1X), conforme o protocolo de Herring, Inglis, Ojeh, Snodgrass, & Menzies (1982). Após a polimerização foram aplicados 8 µL dos produtos obtidos na Nested-PCR juntamente com 2 µL de corante Blue Green Loading Dye I. Este corante foi aplicado na mesma proporção com 2 µL do marcador de peso molecular (PM) de 123 pb, diluído em 6 µL de TBE. Posteriormente foi adicionado o tampão de corrida (TBE1X) na cuba de eletroforese horizontal até cobrir o gel, sendo executada a corrida na voltagem de 120 V e corrente elétrica de 400 mA, com duração de 30 a 40 minutos. O gel foi visualizado e fotografado em aparelho de foto documentação de gel (Vilber Loumart) e as amostras que apresentaram amplicons em tamanhos adequados para o HBoV foram submetidas a purificação e sequenciamento.

Na etapa de purificação utilizou-se as enzimas ExoSAP-IT® (ThermoFisher, USA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, com a finalidade de remover o excesso de primers não incorporados que podem interferir no resultado de sequenciamento. A técnica consistiu na adição de 5 µL do produto da Nested-PCR com 2 µL da enzima ExoSAP-IT®. Essa mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e posteriormente a 80°C por 15 minutos e os produtos foram estocados a -20°C.

A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos iniciadores do Nested-PCR para HBoV e conduzida

segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator® v.3.1 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas e editadas utilizando o programa Bioedit v.7.0.5. e em seguida comparadas com outras amostras de HBoV depositadas no banco de genes GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta BLAST. Para a análise filogenética foi adotado o método de Neighbour-joining, onde a matriz de distância, usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura, foi calculada a partir das sequências alinhadas. Os dendogramas foram construídos no programa MEGA v.5.0.1. A análise de bootstrap realizada usando 2.000 réplicas, obtendo-se resultados reprodutíveis e proporcionando maior confiabilidade aos agrupamentos.

Todos os dados obtidos neste estudo foram analisados pelo software Bioestat 5.3 (Ayres, Ayres Junior, Ayres, & Santos, 2007). Na análise bivariada verificou-se a associação entre cada uma das variáveis independentes (sexo e idade) com as variáveis dependentes (positividade para o HBoV e coinfeção) pelo teste qui-quadrado (χ^2). P valor <0,05 foi considerado estatisticamente significativo sendo adotado o Intervalo de Confiança (IC) de 95%. Os dados deste estudo, bem como os gráficos foram organizados e montados em planilhas do Microsoft Office Excel 2010.

3. Resultados

A Tabela 1 apresenta a quantidade de casos positivos para o HBoV, sendo distribuídos em 3 grupos nas seguintes faixas etárias: 0 a 9 dias, 10 a 19 dias e 20 a 28 dias de vida. Também demonstra a frequência do vírus identificada no sexo feminino e masculino.

Tabela 1 - Associação entre as variáveis faixa etária e gênero e a infecção pelo HBoV em neonatos hospitalizados em Belém do Pará, no período de janeiro a dezembro de 2011.

Variáveis	Infecção por HBoV						p*
	HBoV (+)		HBoV (-)		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Faixa etária (em dias)							
0 - 9	6	30	28	35	34	34	0,6263
10 - 19	8	40	36	45	44	44	
20 - 28	6	30	16	20	22	22	
Sexo							
Masculino	9	45	43	53,7	52	52	0,4836
Feminino	11	55	37	46,3	48	48	
Total	20	100	80	100	100	100	

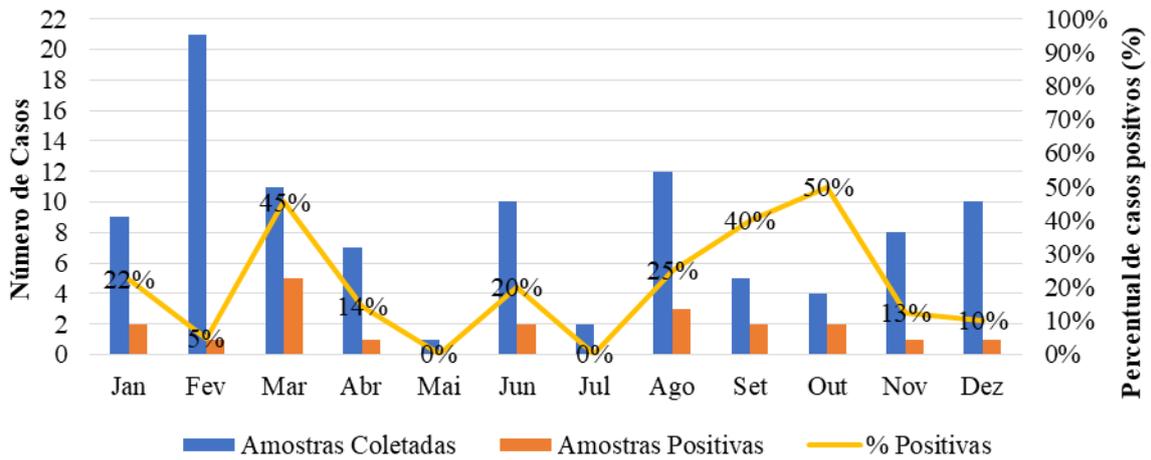
Fonte: Autores.

Foi possível observar que a positividade para o HBoV ocorreu em 20% (20/100) dos neonatos, observando-se uma ligeira maior frequência nos neonatos que apresentavam 10 a 19 dias de vida, representando 40% dos casos (8/20), sendo que do total de amostras coletadas 44% apresentavam-se nessa faixa etária. No que diz respeito ao gênero, observou-se que 55% (11/20) dos neonatos infectados pelo HBoV eram do sexo feminino, entretanto a maioria das amostras coletadas pertenciam ao gênero masculino (52%). Analisando-se os dados apresentados, conclui-se que não houve significância estatística em ambos aspectos epidemiológicos.

Na Figura 1 é observada a distribuição temporal dos casos de HBoV ao longo do ano de 2011, sendo que o número de

amostras coletadas por mês está representado pela barra na cor azul, as amostras positivas pela barra na cor laranja e a linha em amarelo representa o percentual de casos positivos no referido ano.

Figura 1 - Frequência mensal de HBoV humano detectado por qPCR em 100 amostras fecais de neonatos hospitalizados em Belém do Pará no período de janeiro a dezembro de 2011.

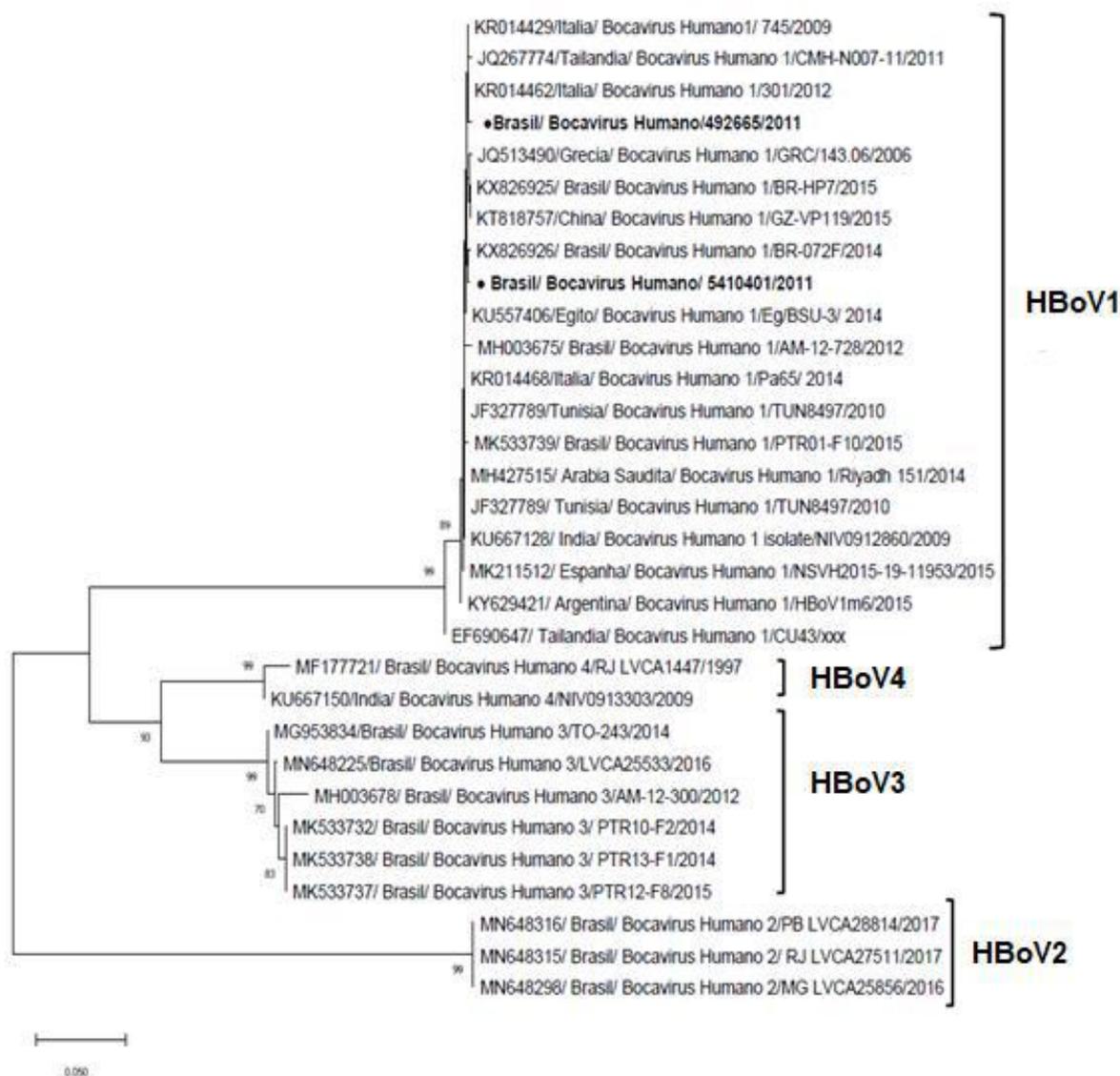


Fonte: Autores.

Como mostra a Figura 1 a prevalência do HBoV ocorreu nos meses de março, setembro e outubro. Vale ressaltar que nos meses de maio e julho não foi detectada positividade para o vírus.

Dentre os 20 espécimes fecais positivos para o HBoV, foi possível sequenciar e analisar 2 amostras (10%), as quais amplificaram na Nested-PCR, sendo identificado o tipo HBoV1 circulando entre os neonatos, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Análise filogenética do gene VP1 de HBoV detectadas em amostras fecais de neonatos hospitalizados em Belém do Pará no período de janeiro a dezembro de 2011. Os espécimes do presente estudo estão em negrito.



Fonte: Autores.

Percebe-se que as 2 amostras positivas para o HBoV agruparam-se com espécimes oriundos de diversos países, como: Itália, Tailândia, Grécia, Brasil, Egito, China, Tunísia, Arábia Saudita, Índia, Espanha e Argentina.

Foi possível identificar vírus entéricos em 32% (32/100) dos espécimes fecais, ocorrendo monoinfecção em 29% (29/100) dos casos, observando-se a maior frequência do HBoV em 18% (18/100), seguido do RVA em 7% (7/100), astrovírus em 2% (2/100) e norovírus em 2% (2/100). Ao analisar a coinfeção geral, esta ocorreu em 3% (3/100), sendo 2% (2/100) entre o HBoV e RVA e, em 1% (1/100) foi identificada a coinfeção entre o RVA e o astrovírus. No que tange a coinfeção entre os casos positivos para o HBoV ocorreu entre o HBoV e o RVA apresentando frequência de 10% (2/20), conforme demonstração na Tabela 2.

Tabela 2 - Coinfecção envolvendo o bocavírus humano e rotavírus da espécie A em neonatos hospitalizados em Belém do Pará no período de janeiro a dezembro de 2011.

PACIENTE	GENÓTIPO DE HBoV	TIPO RVA
492665	HBoV1	G1
5410401	*NI	G1

*NI: Não identificada. Fonte: Autores.

Observa-se que das duas amostras nas quais ocorreram a coinfecção entre o HBoV e RVA, foi possível realizar a caracterização em apenas um espécime e o genótipo envolvido foi o HBoV1.

4. Discussão

A detecção de HBoV em amostras fecais de crianças com quadro de diarreia tem ganhado destaque desde que este vírus foi identificado como possível causador da GA (Albuquerque et al., 2007; Vicente et al., 2007). A sua presença em amostras fecais de crianças menores de 5 anos tem sido relatada com distribuição global (Alam et al., 2015; Albuquerque et al., 2007; De et al., 2017; Jin et al., 2011). Todavia, até o presente momento não há um esclarecimento sobre a relação deste vírus com a GA, pois enquanto alguns estudos sugerem que o HBoV é um potencial patógeno para as ocorrências nas infecções gastrointestinais (Rikhotso et al., 2020; Vicente et al., 2007), outros mesmo havendo alta prevalência do HBoV, contestam o seu real potencial patogênico, devido à coinfecção com outros vírus entéricos (Albuquerque et al., 2007; Arthur et al., 2009; Jin et al., 2011; Malta et al., 2020).

No que concerne à prevalência do HBoV nos neonatos participantes da presente pesquisa, foi observada a positividade em 20% (20/100) dos casos analisados. Tais achados corroboram ao que foi apresentado em outros estudos envolvendo crianças nessa faixa etária, utilizando o mesmo método diagnóstico, os quais relataram a frequência do HBoV entre aproximadamente 10% e 23%, em crianças menores de 2 anos de idade (Alam et al., 2015; Jin et al., 2011; Malta et al., 2020; Proenca-Modena et al., 2013). Portanto, diante dos resultados apresentados, bem como de outras pesquisas que utilizaram a qPCR com método diagnóstico, percebe-se que a escolha de uma técnica com alta sensibilidade de detecção viral é um fator que reflete na frequência do vírus.

A detecção do HBoV varia conforme a idade da criança, pois a medida que esta vai se desenvolvendo os anticorpos maternos vão diminuindo e conseqüentemente ocorre um aumento da taxa de detecção deste vírus. A maior taxa de detecção é relatada entre as idades de 1 a 2 anos, fase em que a criança começa a levar objetos à boca e também a consumir a mesma refeição da família, e posteriormente ocorre redução da detecção viral, o que pode ser explicado pela imunidade protetora adquirida após a exposição ao vírus (Nantachit et al., 2021).

O presente estudo é pioneiro em investigação de HBoV exclusivamente em neonatos. Até o presente momento, as publicações de estudos envolvendo crianças de 0-28 dias têm apresentado os resultados distribuídos em grupos de idade, sendo que a frequência do HBoV é geralmente apresentada nos extratos das faixas etárias de 0 a 6 meses e de 0 a 2 anos, o que dificultou a correlação dos resultados encontrados neste estudo com de outras pesquisas envolvendo recém-nascidos. Dentro desse contexto e com base nos dados disponíveis, os estudos têm relatado que a presença do HBoV nas infecções neonatais se manifesta com baixa frequência, presumindo-se que os anticorpos maternos adquiridos durante a gestação e amamentação influenciam nesta baixa taxa de detecção (Campos et al., 2016; Nantachit et al., 2021; Tymentsev et al., 2016). Todavia, tais resultados divergem dos observados na presente pesquisa e isso pode ser explicado pelas diferentes técnicas empregadas, já que nos estudos citados foi utilizada a técnica de Nested-PCR para detecção do HBoV e estudos que utilizam a qPCR como

método diagnóstico apresentam resultados semelhantes aos observados neste estudo (Alam et al., 2015; Jin et al., 2011; Malta et al., 2020; Proenca-Modena et al., 2013).

Ao analisar o perfil epidemiológico dos neonatos participantes do presente estudo, notou-se que não houve significância estatística para as variáveis analisadas (sexo e idade). A média de idade dos casos positivos foi de 14,9 dias. Apesar de ter apresentado ligeira maior frequência na faixa etária de 10 a 19 dias, e pelo fato de a transmissão deste vírus envolver a via fecal-oral, é improvável que a maior detecção do vírus nessa faixa etária esteja relacionada a transmissão pela ingestão alimentar, visto que até onde se sabe não existe variação quanto a forma de alimentação dentro o grupo de idade analisado. A alimentação de neonatos hospitalizados depende do estado clínico do paciente. Em situações em que não é possível o aleitamento materno exclusivo, deve ser fornecido ao neonato leite humano pasteurizado ou fórmulas lácteas procedentes respectivamente de banco de leite humano e lactário, administrados por meio de sondas enterais (inseridas via oral ou nasogástrica), através de copinho, mamadeira ou seringa (OPAS, 2017). Contudo é sabido que a transmissão de vírus entéricos pode ocorrer por meio do parto via vaginal, pelo contato com fezes da mãe (Brasil, 2014), fazendo-se necessário a investigação da presença deste vírus, exclusivamente em recém-nascidos, associado ao tipo de parto. Quanto a presença do vírus por faixa etária e a comparação com outras pesquisas, não foi possível fazer esta correlação, visto que os estudos que incluem crianças de 0 a 28 dias não descrevem a prevalência do HBoV somente nessa faixa etária.

Com relação ao gênero, apesar de a maioria dos participantes pertencerem ao sexo masculino, observou-se que 55% dos casos positivos eram do sexo feminino, entretanto, não houve significância estatística. Estes achados corroboram com os resultados apresentados por Proenca-Modena et al. (2013), em um estudo realizado no Paraguai, em que a maioria dos participantes também era do sexo masculino, todavia a frequência do HBoV foi mais prevalente no sexo feminino, com taxa de positividade de 4,6% e 6%, respectivamente, também sem associação estatisticamente significativa. Já em outra investigação conduzida no Brasil, a prevalência do HBoV foi oposta à encontrada na presente análise, onde observou-se uma taxa de positividade do HBoV em 14,1% dos casos no sexo masculino e 10,5% no sexo feminino, porém também não foi relatada significância estatística (Malta et al., 2020). Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o sexo não é um fator determinante para a ocorrência das infecções por HBoV, visto que não houve significância estatística nos respectivos estudos, mesmo quando a infecção acometeu mais um gênero que o outro, entretanto faz-se necessário a realização de pesquisas que envolvam somente neonatos para elucidar se além dos fatores regionais a faixa etária influencia na prevalência entre os gêneros.

Quando analisamos a distribuição temporal das infecções por HBoV percebe-se que não houve um padrão sazonal. As infecções ocorreram ao longo do ano de 2011, observando-se uma curva crescente no período de agosto a outubro, com maior pico em outubro, período com menor registro pluviométrico, corroborando com achados de Soares et al. (2019), os quais relataram maior detecção do HBoV durante os meses com menor ocorrência de chuvas na região Norte. Tal fato também foi observado por Linhares et al. (2000), quando reportaram aumento da ocorrência de diarreia infantil por RVA no Norte do Brasil no mesmo período.

Quando verificamos a sazonalidade do HBoV em outros países, alguns estudos sugerem que o HBoV tem pico sazonal durante os meses de outono e inverno (Jin et al., 2011; Tymentsev et al., 2016), enquanto outros colocam que nos meses de verão e primavera há maior ocorrência (Arthur et al., 2009; Nantachit et al., 2021). Diante do exposto, pode-se perceber que a prevalência do HBoV é influenciada pelos aspectos geográficos o qual desempenha importante papel na sazonalidade do vírus. Outros fatores como tempo de estudo, região, diferenças climáticas e econômicas, cultura e os hábitos de higiene pessoal e dos alimentos também podem influenciar na prevalência do vírus, uma vez que a transmissão ocorre por meio da via fecal-oral.

Além do método empregado para o diagnóstico das infecções por HBoV, a escolha dos iniciadores utilizados para

amplificação genômica do vírus também assume grande relevância, visto que ao utilizar-se iniciadores que amplificam os quatro tipos do HBoV, existe a possibilidade de apresentar maior frequência de detecção. Contudo, neste estudo, apesar da utilização dos iniciadores que amplificam os quatro genótipos do HBoV e, ainda que o HBoV2, HBoV3 e HBoV4 estejam relacionados às infecções gastrointestinais e o HBoV1 às infecções respiratórias, na presente análise, foi encontrado apenas o tipo HBoV1 em 2 espécimes fecais. Tais achados estão de acordo com os resultados de Soares et al.(2019), realizado na região Norte do Brasil com amostras fecais coletadas no período de novembro de 2011 a novembro de 2012, em que apesar de terem sido encontrados os genótipos HBoV1, HBoV2 e HBoV3, a predominância foi do HBoV1 em 94,8% dos casos positivos, corroborando com os achados da presente pesquisa.

Quando realizada a comparação da prevalência do HBoV1 com os resultados de estudos realizados em outra região do Brasil, percebe-se que este genótipo também foi o mais prevalente no estudo de Sousa e colaboradores (2012), na região Centro-Oeste no período de 1994 a 2004, com frequência de 91,6%. Entretanto, em outras pesquisas envolvendo este vírus no trato gastrointestinal, realizadas nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul com amostras coletadas no período de 2014 a 2017 a identificação do HBoV1 também foi relatada, porém com menor frequência, quando comparado com outros genótipos identificados (Castro et al., 2019; Malta et al., 2020; Watanabe et al., 2018). Diante dos resultados apresentados nos estudos citados, percebe-se que houve uma mudança da prevalência dos genótipos do HBoV, no período de 2014 a 2016, onde o HBoV3 assumiu prevalência em dois dos estudos com amostras coletadas nesse período. Já em outra pesquisa com amostras coletadas em 10 estado brasileiros no período de 2016 a 2017, a maior frequência relatada foi do HBoV2. Dessa forma, infere-se que tais mudanças possam estar relacionadas às alterações climáticas, que têm ocorrido nos últimos anos, ou até mesmo devido tempo do estudo, visto que já foram relatadas variações da prevalência dos genótipos em pesquisas realizadas por um período maior que um ano em outros países (Jin et al., 2011; Nantachit et al., 2021; Tymentsev et al., 2016). Como esta pesquisa se limita há apenas um ano de estudo, não foi possível identificar se o tempo foi fator determinante para detecção de apenas um genótipo de HBoV.

No que tange à coinfeção do HBoV com outros vírus entéricos, esta envolveu somente o HBoV e RVA, observando-se uma frequência de 10% (2/20) dos casos. A coinfeção entre o HBoV com outros agentes virais como: adenovírus, astrovírus, norovírus tem sido relatada a nível mundial, entretanto é comumente observada a codetecção do HBoV como o RVA em maior frequência, confirmando com os achados desta pesquisa (Alam et al., 2015; Albuquerque et al., 2007; Allander et al., 2007; Chhabra et al., 2013; Jin et al., 2011; Rikhotso et al., 2020; Soares et al., 2019; Sousa et al., 2012). Apesar do HBoV ter sido identificado em 62,5% (20/32) das amostras positivas para os vírus entéricos investigados, não é possível afirmar que ele é um agente causador de GA em neonatos, uma vez que os participantes da presente pesquisa eram assintomáticos para GA. Além do mais, devido à falta de dados sobre o estado clínico dos participantes, infere-se que o HBoV assume um papel oportunista, sendo necessário melhor esclarecimento da sua ação no TGI em estudos futuros que englobem o tipo de parto e se os participantes apresentam sintomas de infecção do trato respiratório, visto que este genótipo está relacionado principalmente as infecções neste sítio.

A presente investigação apresentou algumas limitações, incluindo: indisponibilidade das amostras fecais coletadas em outros períodos e informações incompletas sobre os dados clínicos. Porém, vale mencionar que essa é uma investigação pioneira que reporta a detecção do HBoV exclusivamente em neonatos.

5. Conclusão

Os achados do presente estudo apontam que a frequência do HBoV varia conforme a técnica empregada para a detecção do vírus; as infecções por HBoV não foram correlacionadas à faixa etária e gênero; a detecção do HBoV ocorreu

durante a maior parte do ano investigado, portanto não demonstrou nenhum padrão sazonal; o genótipo HBoV1 foi o único detectado; os aspectos epidemiológicos da infecção pelo HBoV em casos de GA em neonatos são raros, não apenas no Brasil, como no mundo todo, não sendo possível fazer uma comparação mais precisa entre os resultados encontrados na presente análise com estudos já publicados; a ocorrência de coinfeção do HBoV com outros vírus foi relatada somente com o RVA, contudo, faz-se necessário estudos complementares para investigação do HBoV e outros agentes entéricos importantes, para melhor elucidação da presença do HBoV nas infecções gastrointestinais.

Não se pode inferir que o HBoV seja um agente causador da GA, visto que a presença do vírus foi identificada em neonatos assintomáticos. Sugere-se que em trabalhos futuros, envolvendo a presença do HBoV no TGI de neonatos, seja investigado se os recém-nascidos apresentam ou não sintomas respiratórios, dado que este vírus também é um agente causador de infecções respiratórias, e também sobre o tipo de parto, haja vista que a contaminação pode ocorrer por meio do parto normal.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os profissionais da Seção de Virologia/IEC que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta pesquisa, bem como a todos aos Professores do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia e Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas e em especial aos doutores Jones Siqueira, Hugo Resque e Jannifer Chiang por toda contribuição para melhoria deste estudo.

Referências

- Alam, M. M., Khurshid, A., Shaukat, S., Sharif, S., Suleman, R. M., Angez, M., Nisar, N., Aamir, U. B., Naeem, M., & Zaidi, S. S. Z. (2015). Human bocavirus in Pakistani children with gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 87(4), 656–663. <https://doi.org/10.1002/jmv.24090>
- Albuquerque, M. C. M., Rocha, L. N., Benati, F. J., Soares, C. C., Maranhão, A. G., Ramírez, M. L., Erdman, D., & Santos, N. (2007). Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13(11), 1756–1758. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070671>
- Allander, T., Jarti, T., Gupta, S., Niesters, H. G. M., Lehtinen, P., Usterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B. G., Hyypia, T., & Ruuskanen, O. (2007). Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. *Clinical Infectious Diseases*, 44(7), 904–910. <https://doi.org/10.1086/512196>
- Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., & Andersson, B. (2005). From The Cover: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12891–12896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
- Arthur, J. L., Higgins, G. D., Davidson, G. P., Givney, R. C., & Ratcliff, R. M. (2009). A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000391. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000391>
- Ayres, M., Ayres Junior, M., Ayres, D. L., & Santos, A. de A. S. dos. (2007). *BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDSM / MCT / CNPq. (5ªed.). Belém, 324.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.3.495-503.1990>
- Brasil. (2012). Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. *Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012*. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html
- Brasil. (2014). Ministério da Saúde. *Manual AIDPI neonatal: quadro de procedimentos*. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas, Organização Pan-Americana da Saúde (5ª ed.). Brasília: Ministério da Saúde. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/maual_aidpi_neonatal_quadro_procedimentos.pdf
- Brasil. (2019). Ministério da Saúde do Brasil. *Guia de vigilância em saúde: volume único (recurso eletrônico)*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços (3ª ed.). Brasília: Ministério da Saúde. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf
- Brasil. (2021). Ministério da Saúde. DATASUS - Departamento de Informática do SUS. *Ministério da Saúde. DATASUS*. <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>
- Campos, G. S., Silva Sampaio, M. L., Menezes, A. D. L., Tigre, D. M., Moura Costa, L. F., Chinalia, F. A., & Sardi, S. I. (2016). Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *Journal of Medical Virology*, 88(1), 166–170. <https://doi.org/10.1002/jmv.24293>

- Carvalho, T. C. N. de, Gabbay, Y. B., Siqueira, J. A. M., Linhares, A. da C., & Parente, A. T. (2014). Conhecimento sobre gastroenterite viral pelos profissionais de saúde de um hospital materno-infantil de referência no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 11–18. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000300002>
- Castro, L. R. P., Calvet, F. C., Sousa, K. L., Silva, V. P., Lobo, P. S., Penha Junior, E. T., Guerra, S. F. S., Bezerra, D. A. M., Mascarenhas, J. D. P., Pinheiro, H. H. C., Costa, I. B., Resque, H. R., & da Silva Soares, L. (2019). Prevalence of rotavirus and human bocavirus in immunosuppressed individuals after renal transplantation in the Northern region of Brazil. *Journal of Medical Virology*, jmv.25569. <https://doi.org/10.1002/jmv.25569>
- Chhabra, P., Payne, D. C., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Shirley, S. H., Wiksw, M., Nix, W. A., Lu, X., Parashar, U. D., & Vinjé, J. (2013). Etiology of Viral Gastroenteritis in Children <5 Years of Age in the United States, 2008–2009. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(5), 790–800. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit254>
- De, R., Liu, L., Qian, Y., Zhu, R., Deng, J., Wang, F., Sun, Y., Dong, H., Jia, L., & Zhao, L. (2017). Risk of acute gastroenteritis associated with human bocavirus infection in children: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 12(9), e0184833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184833>
- Hernandez, J. M., Neri, D. L., Fadul, F. A., Abreu, B. M., Barbosa, M. P. O., Carneiro, I. C. R., Lucena, M. S., Siqueira, J. A. M., Reymao, T. K. A., Portal, T. M., Aragão, G. C., Teixeira, D. M., Mascarenhas, J. D. P., & Gabbay, Y. B. (2012). *Detection of norovirus and astrovirus in samples from neonates and children hospitalized at a public hospital, Belém, Pará, Brazil*. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of Brazilian Society of Tropical Medicine, 623–1155. <https://patua.iec.gov.br/bitstream/handle/iec/1992/Detection%20of%20norovirus%20and%20astrovirus%20in%20samples%20from%20neonates%20and%20children%20hospitalized%20at%20a%20public%20hospital%2c%20Bel%a9m%2c%20Par%a1%2c%20Brazil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Herring, A. J., Inglis, N. F., Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R., & Menzies, J. D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 473–477. <https://doi.org/10.1128/JCM.16.3.473-477.1982>
- Hochman, B., Nahas, F. X., Oliveira Filho, R. S. de, & Ferreira, L. M. (2005). Desenhos de pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20(suppl 2), 2–9. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502005000800002>
- Jin, Y., Cheng, W., Xu, Z., Liu, N., Yu, J., Li, H., Jin, M., & Li, D. (2011). High prevalence of human bocavirus 2 and its role in childhood acute gastroenteritis in China. *Journal of Clinical Virology*, 52(3), 251–253. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.012>
- Kapoor, A., Simmonds, P., Slikas, E., Li, L., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., Triki, H., Bahri, O., Oderinde, B. S., Baba, M. M., Bukbuk, D. N., Besser, J., Bartkus, J., & Delwart, E. (2010). Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone, and Prevalent in Enteric Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(11), 1633–1643. <https://doi.org/10.1086/652416>
- Khamrin, P., Malasao, R., Chaimongkol, N., Ukarapol, N., Kongsricharoem, T., Okitsu, S., Hayakawa, S., Ushijima, H., & Maneekarn, N. (2012). Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(3), 565–569. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.025>
- La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Donia, D., Cenko, F., Xhelilaj, G., Cozza, P., & Divizia, M. (2016). Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *Journal of Medical Virology*, 88(5), 906–910. <https://doi.org/10.1002/jmv.24415>
- Lasure, N., & Gopalkrishna, V. (2017). Molecular epidemiology and clinical severity of Human Bocavirus (HBoV) 1-4 in children with acute gastroenteritis from Pune, Western India. *Journal of Medical Virology*, 89(1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/jmv.24593>
- Ligozzi, M., Diani, E., Lissandrini, F., Mainardi, R., & Gibellini, D. (2017). Assessment of NS1 gene-specific real time quantitative TaqMan PCR for the detection of Human Bocavirus in respiratory samples. *Molecular and Cellular Probes*, 34, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.04.005>
- Lima, R. M.; Dias, J. A. (2010). Gastroentrite Aguda. *Nascer e Crescer*, 19(2), 85–90. <https://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/698/1/v19n2artGastro.pdf>
- Linhares, A. C. (2000). Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(3), 629–646. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2000000300012>
- Malta, F. C., Varella, R. B., Guimarães, M. A. A. M., Miagostovich, M. P., & Fumian, T. M. (2020). Human bocavirus in Brazil: Molecular epidemiology, viral load and co-infections. *Pathogens*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080645>
- Moraes, M. B., Cruz, A. S., Sadovsky, A. D. I., Brandt, K. G., Epifânio, M., Toporovski, M. S., Carvalho, S. R., Gomes, R. C., & Silva, L. R. (2017). Diarreia aguda: diagnóstico e tratamento. *Departamento Científico De Gastroenterologia*, 1, 1–15. https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2017/03/Guia-Pratico-Diarreia-Aguda.pdf
- Nantachit, N., Kochjan, P., Khamrin, P., Kumthip, K., & Maneekarn, N. (2021). Human bocavirus genotypes 1, 2, and 3 circulating in pediatric patients with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2012–2018. *Journal of Infection and Public Health*, 14(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.12.007>
- Neri, D. L. (2012). *Deteção e caracterização molecular de rotavírus associado a casos esporádicos e surtos de gastroenterite em neonatos e crianças antes e após a introdução da vacina contra rotavírus*. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária da Amazônia) - Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas, Ananindeua.
- Nora-Krukke, Z., Vilmane, A., Xu, M., Rasa, S., Ziemele, I., Silina, E., Söderlund-Venermo, M., Gardovska, D., & Murovska, M. (2018). Human bocavirus infection markers in peripheral blood and stool samples of children with acute gastroenteritis. *Viruses*, 10(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/v10110639>
- OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. (2017). *Prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde em neonatologia*. Centro Latino-Americano de Perinatologia, Saúde da Mulher e Reprodutiva. Montevidéu: Organização Pan-Americana da Saúde. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34361/9789275719640-por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Paloniemi, M., Lappalainen, S., Salminen, M., Kätkä, M., Kantola, K., Hedman, L., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M., & Vesikari, T. (2014). Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. *European Journal of Pediatrics*, 173(8), 1051–1057. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2290-x>

Proenca-Modena, J. L., Martinez, M., Amarilla, A. A., Espínola, E. E., Galeano, M. E., Fariña, N., Russomando, G., Aquino, V. H., Parra, G. I., & Arruda, E. (2013). Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2576–2580. <https://doi.org/10.1017/S095026881300023X>

Rikhotso, M. C., Khumela, R., Kabue, J. P., Traoré-Hoffman, A. N., & Potgieter, N. (2020). Predominance of Human Bocavirus Genotype 1 and 3 in Outpatient Children with Diarrhea from Rural Communities in South Africa, 2017–2018. *Pathogens*, 9(4), 245. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040245>

Soares, L. S., Lima, A. B. F., Pantoja, K. C., Lobo, P. S., Cruz, J. F., Guerra, S. F. S., Bezerra, D. A. M., Bandeira, R. S., & Mascarenhas, J. D. P. (2019). Molecular epidemiology of human bocavirus in children with acute gastroenteritis from North Region of Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 68(8), 1233–1239. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001026>

Sousa, T. T. De, Souza, M., Fiaccadori, F. S., Borges, A. M. T., Costa, P. S. da, & Cardoso, D. das D. de P. (2012). Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6), 800–804. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000600015>

Tymntsev, A., Tikunov, A., Zhirakovskaia, E., Kurilshchikov, A., Babkin, I., Klemesheva, V., Netesov, S., & Tikunova, N. (2016). Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.015>

Vicente, D., Cilla, G., Montes, M., Pérez-Yarza, E. G., & Pérez-Trallero, E. (2007). Human Bocavirus, a Respiratory and Enteric Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 636–637. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061501>

Watanabe, A. S. A., Luchs, A., Leal, É., Milagres, F. A. de P., Komninakis, S. V., Gill, D. E., Lobato, M. C. A. B. S., Brustulin, R., das Chagas, R. T., Abrão, M. de F. N. D. S., Soares, C. V. de D. A., Deng, X., Sabino, E. C., Delwart, E., & da Costa, A. C. (2018). Complete Genome Sequences of Six Human Bocavirus Strains from Patients with Acute Gastroenteritis in the North Region of Brazil. *Genome Announcements*, 6(17), e00235-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00235-18>

WHO, World Health Organization. (2018). *Number of deaths in children aged <5 years, by cause*. Number of Deaths in Children Aged <5 Years, by Cause. <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-deaths>

Zhou, T., Chen, Y., Chen, J., Hu, P., Zheng, T., Xu, X., & Pei, X. (2017). Prevalence and clinical profile of human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Chengdu, West China, 2012–2013. *Journal of Medical Virology*, 89(10), 1743–1748. <https://doi.org/10.1002/jmv.24787>