

PRIMER REPORTE DE SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE BOCAVIRUS HUMANO 1 AISLADO EN ARGENTINA.

FIRST REPORT OF COMPLETE GENOME SEQUENCE AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN BOCAVIRUS 1 ISOLATED IN ARGENTINA.

Agustina Cardozo Tomás*, **Lucía María Ghietto****, **Constanza Insfrán**, **Nicolás Wasinger**, **Ariana Marchesi**, **María Pilar Adamo**

RESUMEN

Antecedentes. El Bocavirus humano (HBoV) es un parvovirus descrito por primera vez en 2005, asociado a cuadros leves y graves de infección respiratoria aguda (IRA), una de las principales causas de morbimortalidad en la población infantil en todo el mundo. Al presente se han identificado 4 genotipos, nombrados HBoV1 a 4, de los cuales el primero es el que se asocia a IRA con predominancia.

Objetivo. Obtener el genoma completo de HBoV respiratorio aislado localmente.

Métodos. Se diseñaron primers para fragmentos superpuestos del genoma completo de HBoV, empleando las herramientas informáticas ClustalW y NCBI Primer-Blast. Los fragmentos se amplificaron por PCR convencional y se secuenciaron mediante tecnología capilar BigDye Terminator. La edición de las secuencias y análisis filogenético se realizó con el programa MEGA v6.

Resultados. Se obtuvo la secuencia genómica completa de HBoV1 cepa 307AR09, aislada de secreción respiratoria de paciente pediátrico con bronquiolitis. La misma fue depositada en la base de datos GenBank con número de acceso KJ634207. El análisis filogenético con secuencias genómicas completas de los 4 genotipos obtenidas en distintas regiones del mundo muestra similitud cercana al 100% con la secuencia original descubierta en Suecia (DQ000495), así como el agrupamiento de los 4 genotipos en 2 clusters de alta homología interna: HBoV1-HBoV3 y HBoV2-HBoV4.

Conclusiones. Se aportan datos locales para futuros desarrollos tecnológicos destinados tanto a la investigación como al diseño de métodos diagnósticos para la práctica médica. Por otra parte, los resultados sustentan la propuesta de redistribución taxonómica de los 4 genotipos en 2 especies.

Palabras clave: HBoV1; genoma completo; Argentina; análisis filogenético.

ABSTRACT

Antecedents. Human bocavirus (HBoV) is a parvovirus identified for the first time in 2005 associated to upper- and lower- acute respiratory tract infection (ARI), which is one of the main causes of morbimortality in infant population worldwide. Currently four genotypes have been described named HBoV1-4, of which HBoV1 is the one predominantly related to ARI.

Objective. To obtain the complete genome of respiratory HBoV locally isolated.

Methods. By means of bioinformatics tools such as ClustalW and NCBI Primer-Blast, primers were designed to amplify overlapping DNA fragments altogether spanning the complete genome of HBoV. Fragments were amplified by PCR and sequenced by BigDye Terminator capillary technology. Sequence editing and phylo-

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. *Becaria PROMED (FCM – UNC). **Becaria CONICET.

Correspondencia:

María Pilar Adamo Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Calle Enf. Gordillo Gómez S/N, Ciudad Universitaria. CP 5016, Córdoba, Argentina.

e-mail: mpadamo@fcm.unc.edu.ar

Tel. 54-351-4334022 interno 34

genetic analysis were accomplished using MEGA v6 software.

Results. Complete genome sequence of HBoV1 strain 307AR09 was obtained after isolation from respiratory secretion of a pediatric patient with bronchiolitis. The sequence was deposited in the GenBank public database (accession number KJ634207). The phylogenetic analysis including complete genome sequences of all four genotypes from around the world shows similarity close to 100% between the local strain and the virus originally discovered in Sweden (DQ000495). The four genotypes clustered in 2 groups of high internal homology: HBoV1-HBoV3 and HBoV2-HBoV4.

Conclusions. We provide local molecular data that can be used in future technological developments for research and diagnostic tests intended for medical practice. Our results add support to the proposed redistribution of the four genotypes into 2 species.

Keywords: HBoV1; complete genome; Argentina; phylogenetic analysis.

INTRODUCCIÓN

La infección respiratoria aguda (IRA) constituye una de las primeras causas de morbimortalidad infantil en todo el mundo ⁽¹⁾. Los virus son los agentes patógenos predominantes en la IRA ⁽²⁾ y los principales agentes de neumonía pediátrica (en menores de 5 años) adquirida en la comunidad ⁽³⁾. Entre ellos se incluye al Bocavirus Humano1 (HBoV1), un parvovirus descrito por primera vez en Suecia en el año 2005, identificado a partir de muestras clínicas respiratorias de niños hospitalizados por IRA baja ⁽⁴⁾. Desde entonces se lo ha asociado a IRA alta, exacerbaciones de asma, crisis de sibilancias y cuadros respiratorios graves como neumonía y bronquiolitis ⁽⁵⁻⁷⁾.

La prevalencia del virus varía ampliamente de 0,9 a 33%, según la serie estudiada ^(8,9), aunque en niños pequeños con enfermedad respiratoria baja usualmente se ubica al HBoV en segundo o tercer lugar en frecuencia de detecciones ⁽¹⁰⁻¹²⁾. Investigaciones locales previas han demostrado la presencia de HBoV1 en lactantes con bronquiolitis y neumonía y adultos con enfermedad tipo influenza, con prevalencias de 6 al 23% según el año ⁽¹³⁻¹⁶⁾. Por otra parte, estudios sobre la seroprevalencia para HBoV1 (IgG específica) en individuos de todas las edades muestran su amplia distribución en la población humana e indican que el grupo de máxima incidencia sería el de los niños en edad preescolar ⁽¹⁷⁾. Otros trabajos han demostrado

la temprana incidencia de la infección ^(6,7,9,15,17). La participación de HBoV1 como agente causal independiente en la etiología de patología respiratoria ha sido controvertida en función de la alta tasa de coinfección y su detección en individuos asintomáticos ^(9,18,19). Sin embargo, la presentación clínica podría estar relacionada a la carga viral elevada durante la infección, mientras que la baja carga viral se asociaría a excreción de virus en individuos asintomáticos o portadores sanos ^(15,20,21). Independientemente del mecanismo patogénico, estudios retrospectivos recientes basados en la detección de la infección (ADN viral, IgM, IgG) y su correlación con las manifestaciones clínicas registradas en cada episodio han demostrado que las primoinfecciones se asocian con enfermedad respiratoria (las cuales mayoritariamente ocurren antes de los 2 años de edad), mientras que las reinfecciones serían frecuentes en niños pre-escolares y en edad escolar, no estando asociadas a enfermedad manifiesta ^(17,22). Se han identificado 4 especies de bocavirus humanos, nombrados HBoV1 a 4 ⁽²³⁾. El HBoV1 es el virus identificado originalmente en 2005 y el que se asocia a infección del tracto respiratorio; las otras 3 especies fueron aisladas a partir de muestras del tracto entérico y han sido detectadas en muestras nasales con baja frecuencia ⁽²⁴⁾.

El genoma de HBoV1 tiene aproximadamente 5.300 nucleótidos y está organizado en 3

marcos de lectura: NS1, con funciones en la replicación viral, presente en todos los miembros de la familia Parvoviridae⁽²⁵⁾, NP1 propia de los bocavirus solamente y factor regulador del ciclo viral⁽²⁶⁾ y VP1/VP2, el cual codifica las proteínas estructurales que constituyen la cápside viral y participan en la entrada del virus a la célula. Esta región VP1/VP2 se ha reportado como la de mayor variabilidad genética intraespecífica⁽²³⁾.

Al presente no se han obtenido secuencias completas de cepas argentinas de HBoV1, por ello en este trabajo diseñamos primers para amplificar y secuenciar el genoma completo aislamientos locales de este virus respiratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de HBoV1.

Se utilizó una muestra de secreción respiratoria obtenida por aspirado nasofaríngeo de una niña internada en el Hospital Pediátrico de Córdoba en 2009 con diagnóstico de bronquiolitis. La paciente tenía detección únicamente de HBoV (esta cepa o aislamiento se denominó HBoV1 307_AR09) siendo negativos los resultados de todos los otros tests diagnósticos realizados, incluyendo hemocultivo y PCR en tiempo real para virus respiratorio sincicial, influenza A y B, parainfluenza 1, 2, 3 y 4, adenovirus, y metapneumovirus). Una alícuota de la muestra original había permanecido almacenada a -70°C desde su obtención.

Extracción de ácidos nucleicos.

Se utilizó una alícuota de 50 µl de ANF para extracción de ácidos nucleicos con buffer de guanidina y precipitación con sílica (13,14). El extracto fue resuspendido en buffer TE (10:1) y almacenado a -20°C hasta completar los ensayos de PCR posteriores.

Diseño de primers.

Para la selección de las regiones óptimas de los cebadores o primers se realizó un alineamiento de múltiples secuencias completas de HBoV1 obtenidas de la base de datos pública GenBank (números de acceso NC_007455.1, DQ000496.1, AB480174.1, DQ340570.1, EF203920.1, EF450740.1, FJ858259.1,

GQ925675.1, JF699044.1, JF327789.1, EU984244.1, GQ926983.1, representativas de distintas regiones del mundo). Para el alineamiento se utilizó el programa ClustalW2 (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). El diseño de primers se realizó utilizando los programas Primer Desinging Tool - Primer Blast de National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) y OligoAnalyzer de Integrated DNA Technology (idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer). Se diseñaron pares de primers dirigidos para la amplificación de fragmentos consecutivos y superpuestos del genoma completo de HBoV1 con parámetros de búsqueda estándar. La síntesis de los oligonucleótidos se solicitó a Invitrogen Argentina y los stocks de uso se prepararon con H₂O deionizada (grado PCR) a una concentración de 100 µM.

Amplificación del genoma completo de HBoV1 por PCR.

Inicialmente se utilizaron protocolos de PCR estándares con reactivos de la firma Invitrogen (2,5 mM MgCl₂; 0,8 mM mezcla equimolar de dATP, dTTP, dCTP y dGTP; 0,02 U/µL Taq DNA polimerasa; y 0,4 µM de cada primer, forward y reverse) con un gradiente de temperaturas de annealing, incluyendo la temperatura teórica apropiada para cada par de primers diseñados. Las concentraciones de MgCl₂, dNTPs y primers fueron ajustadas durante el proceso de optimización. Una vez identificadas las mejores condiciones de amplificación se definieron los protocolos finales y luego se realizaron los ensayos de PCR para posterior secuenciación utilizando en este caso la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), en un volumen total de 50 µl por tubo de reacción con 5 µl de templado.

Visualización de los productos de PCR.

Los productos de reacción de los ensayos de optimización fueron visualizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8,5% teñido con solución de nitrato de plata (13,14). Los productos de PCR para secuenciar se corroboraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio

0,5 µg/µl, con el objetivo de comprobar la presencia de producto en la concentración mínima requerida para los ensayos de secuenciación. Secuenciación y análisis genético.

Los productos de amplificación fueron purificados en columnas de extracción Qiagen PCR cleanup kit y la secuenciación se realizó bidireccionalmente en cada fragmento amplificado (Macrogen Inc., Corea), utilizando la tecnología de ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer - BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron editadas, alineadas y ensambladas utilizando el programa Clustal. El genoma completo de HBoV1 cepa AR09_307 se obtuvo mediante la superposición de todos los segmentos de NS1, NP1 y VP1/VP2.

El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA v6 (megasoftware.net) incluyendo secuencias de genomas completos representativas de las cuatro especies de bocavirus humanos identificadas hasta el momento y disponibles en GenBank (números de acce-

so EU918736.1, HQ113143.1, FJ170280.1, NC_012042.1, HM132056.1, GQ200737.1, FJ973558.1, FJ973560.1, NC_012729.2, DQ000495.1, DQ000496.1, NC_007455.1, JQ923422.1). La reconstrucción filogenética se ejecutó siguiendo el método Neighbor Joining realizando la inferencia a partir de matrices de distancia genética basadas en el modelo Kimura-2 parámetros, con bootstrap para 1000 repeticiones.

Aspectos éticos.

El presente plan de trabajo integra un proyecto de investigación de bocavirus humanos que ha sido oportunamente evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en la Investigación en Salud (C.I.E.I.S.) del Niño y del Adulto del Polo Hospitalario Córdoba.

RESULTADOS

Diseño de primers.

Se seleccionaron los pares de oligonucleótidos que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del genoma completo de HBoV1 cepa 307_AR09.

Fragmento	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Posición nucleotídica*	Tm (°C)	Longitud del amplicón (nt)
1	HBoV1_1 (F)	GCCGGCAGACATATTGGATTC	1 a 21	59,6	741
	HBoV1_721 (R)	AGCCTCCTCAGGTTCAAAAGG	721 a 741	59,9	
2	HBoV1_610 (F)	GTTGGGGGAGAAGGACTAAGC	610 a 630	60,1	717
	HBoV1_1307 (R)	GTGCATGCCCAAGACTTGTT	1307 a 1326	59,3	
3	HBoV1_1273 (F)	CTTGAAGGTCAACCAGGAGGG	1273 a 1293	60,3	664
	HBoV1_1915 (R)	ACCACTGTAGAAGAGCTGCAAT	1915 a 1936	59,7	
4	HBoV1_1816 (F)	GTTTCTCATGTTACGCGGC	1816 a 1835	60,5	750
	HBoV1_2546 (R)	ATATGAGCCCGAGCCTCTCT	2546 a 2565	59,9	
5	HBoV1_2274 (F)	GAGACATCGCAAGTGGACTAT	2274 a 2296	57,6	899
	HBoV1_3101 (R)	TTGAGCAGCGGATCAGCGTTA	3172 a 3151	65,3	
6	HBoV1_2945 (F)	ATTACTGGGATGATGTGTACCGT	2945 a 2967	59,3	780
	HBoV1_3724 (R)	CCATGGAGTTGTGACGCAGC	3724 a 3705	61,2	
7	HBoV1_3339 (F)	TGGGAAATAAAGAGAGGCCCAA	3339 a 3361	59,4	950
	HBoV1_4288 (R)	TGCTGTGCTTCCGTTTTGTCT	4288 a 4268	61	
8	HBoV1_4138 (F)	ACTTAGAACTGGTGAGAGCACTG	4138 a 4160	60	990
	HBoV1_5127 (R)	CCGCTTGTCCATTGAGGAGGA	5127 a 5107	62	

*en el genoma con número de acceso en GenBank NC_007455.1. F: forward. R: reverse.

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del genoma completo de HBoV1 cepa 307_AR09.

Optimización de los protocolos de PCR y amplificación de genoma completo de HBoV1. Los protocolos de PCR fueron optimizados mediante el ajuste de la temperatura de annealing, resultando en los procedimientos detallados en la Tabla 2. De acuerdo a lo observado en los geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (de alta sensibilidad) con estos protocolos se lograron bandas nítidas del tamaño esperado y ausencia de bandas inespecíficas. Los mismos se utilizaron en las reacciones finales para la amplificación de los fragmentos a secuenciar, cuyo buen rendimiento quedó corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Tabla 2. Protocolos de PCR optimizados para los distintos pares de primers diseñados en este estudio.

	Fragmentos 1 a 4	Fragmen- to 5	Fragmen- tos 6 a 8
Mezcla de reacción (concentraciones finales)			
Cl ₂ Mg	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTPs	0,8 mM	0,22 mM	0,8 mM
Taq polimerasa	0,02 U/μL	0,02 U/μL	0,02 U/μL
Primers F y R (c/u)	0,40 μM	0,44 μM	0,8 μM
Programa de ciclado			
Desnaturalización	94 °C; 0,5 min.	94 °C; 0,5 min.	94 °C; 0,5 min.
Annealing	55 °C; 0,5 min.	54 °C; 0,5 min.	60 °C; 0,5 min.
Extensión	72 °C; 1 min.	72 °C; 1 min.	72 °C; 1 min.
Extensión final	72 °C; 10 min.	72 °C; 10 min.	72 °C; 7 min.

dNTPs: mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP, dCTP.

Secuenciación y análisis genético.

Los ensayos de secuenciación arrojaron resultados con parámetros de calidad óptima, obteniéndose luego de la edición y compaginación la secuencia completa de HBoV1 cepa 307_AR09, depositada en GenBank con número de acceso KJ634207.

El análisis filogenético incluyendo secuencias de genomas completos representativas de las cuatro especies de bocavirus humanos identificadas al presente (HBoV1-4) expone el agrupamiento de la cepa argentina con otros aisla-

mientos de HBoV1 (Fig. 1).

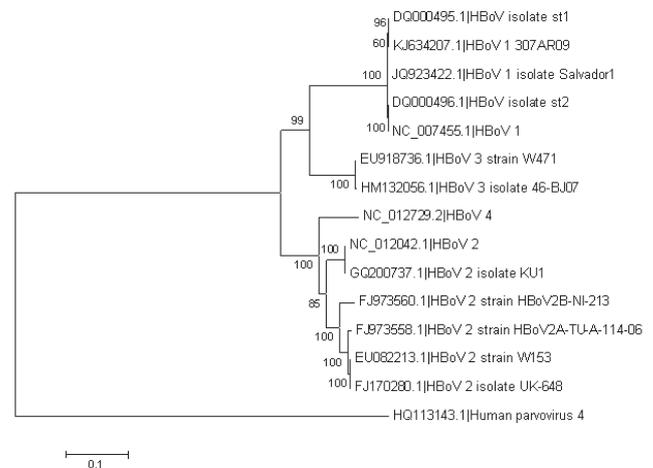


Fig. 1. Árbol filogenético representativo de las distancias genéticas entre los genomas completos de especies de bocavirus humano, incluyendo la cepa HBoV1 307AR09. El parvovirus humano 4 se utilizó como "raíz"; el método de inferencia fue Neighbor Joining con matrices de distancia genética basadas en el modelo Kimura-2 parámetros y bootstrap para 1000 repeticiones. Se observa la mínima distancia genética entre HBoV1 307_AR09 y la secuencia DQ000495 (Suecia, 2005) y el clustering HBoV1-HBoV3 y HBoV4-HBoV2.

Del análisis filogenético surge la alta homología entre la cepa local HBoV1 307_AR09 y otras secuencias de HBoV1, en particular con la cepa DQ000495. Entre estas dos secuencias la distancia genética fue 0,002; por el contrario, la mayor distancia genética al comparar la cepa local HBoV1 307AR09 y otras especies de bocavirus humanos se observó con los genotipos HBoV2 y HBoV4 (Tabla 3).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El conocimiento de las secuencias nucleotídicas de cepas contribuye al acervo genético, al estudio de la biología molecular del virus y al avance en el desarrollo tecnológico de aplicación diagnóstica en el marco de la práctica médica. Con el objetivo de obtener la secuencia del genoma completo de una cepa local de HBoV1 asociado a IRA baja, en este trabajo se amplificaron individualmente segmentos su

Tabla 3

Tabla 3. Distancias genéticas entre los genomas completos de cuatro especies de HBoV, el parvovirus humano 4 y la cepa HBoV1 307_AR09.

Secuencias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 HQ113143.1 Human parvovirus 4	1,198													
2 DQ000495.1 HBoV	1,205	0,005												
3 DQ000496.1 HBoV	1,148	0,293	0,291											
4 EU082213.1 HBoV 2	1,15	0,294	0,292	0,002										
5 FJ170280.1 HBoV 2	1,153	0,293	0,291	0,069	0,069									
6 NC_012042.1 HBoV 2	1,154	0,292	0,29	0,069	0,068	0,001								
7 GQ200737.1 HBoV 2	1,155	0,29	0,291	0,042	0,042	0,081	0,081							
8 FJ973560.1 HBoV 2	1,149	0,296	0,294	0,01	0,011	0,07	0,069	0,043						
9 FJ973558.1 HBoV 2	1,177	0,204	0,203	0,235	0,235	0,238	0,237	0,234	0,238					
10 EU918736.1 HBoV 3	1,173	0,208	0,206	0,236	0,237	0,239	0,238	0,236	0,24	0,004				
11 HM132056.1 HBoV 3	1,178	0,296	0,293	0,122	0,122	0,1	0,099	0,12	0,121	0,236	0,238			
12 NC_012729.2 HBoV 4	1,205	0,005	0	0,291	0,292	0,291	0,29	0,291	0,294	0,203	0,206	0,293		
13 NC_007455.1 HBoV 1	1,199	0,005	0,004	0,292	0,293	0,292	0,291	0,29	0,295	0,204	0,207	0,295	0,004	
14 JQ923422.1 HBoV 1	1,204	0,002	0,005	0,293	0,295	0,293	0,292	0,291	0,296	0,204	0,207	0,295	0,005	0,004
15 KJ634207.1 HBoV1 307_AR09														

perpuestos abarcando el genoma completo del virus, los que luego fueron secuenciados y ensamblados. Se logró obtener la secuencia codificante completa de HBoV1 cepa AR09_307, la cual fue depositada en la base de datos pública GenBank con número de acceso KJ634207. A partir del análisis filogenético realizado con la secuencia KJ634207 y otras cepas seleccionadas entre las disponibles en GenBank representativas de las especies de bocavirus descritas hasta el momento aisladas en distintas regiones geográficas del mundo, se observa que la cepa local obtenida agrupa en el cluster de HBoV1 (Fig. 1), mostrando una homología superior al 99% con otras cepas de HBoV1 (Tabla 3). Se evidenció una particular similitud con la secuencia DQ000495, correspondiente al virus originalmente identificado por Allander y colaboradores en Suecia en el año 2005⁽⁴⁾, constituyendo esta la menor distancia genética de todo el grupo (0,002). Asimismo, el análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas entre las cuatro especies de bocavirus humanos reflejó la mayor distancia entre la cepa HBoV1 AR09_307 y secuencias de las especies HBoV2 y HBoV4, mientras que con la especie HBoV3 fue intermedia (Tabla 3). Esto se aprecia claramente en la representación filogenética (Fig. 3), en la cual se evidencia la divergencia de dos grupos principales: uno constituido por las especies HBoV1-HBoV3, y el segundo por cepas de las especies de HBoV2-HBoV4. Estos resultados no son comparables con análisis realizados sólo en base a fragmentos parciales del genoma, en particular la región VP1/VP2 (27,28) pero concuerdan con análisis de genomas completos realizados por otros autores⁽²⁹⁾ y brindan soporte a la propuesta actual del Comité Internacional de Taxonomía de Virus⁽³⁰⁾ que implica cambiar el nombre del género Bocavirus a Bocaparvovirus y reubicar los tipos HBoV1 y HBoV3 en la especie Bocaparvovirus primate 1, en tanto que los genotipos HBoV2 y HBoV4 corresponderían ahora a la especie Bocaparvovirus primate 2. En referencia a las regiones codificantes individuales (marcos de lectura NS1, NP1 y VP1/

VP2), del análisis genético surgen los siguientes aspectos más relevantes.

Comparando las regiones correspondientes a la proteína NS1 (nucleótidos 253 a 2172) de la cepa AR09_307 con otras de la misma especie de bocavirus (HBoV1), se encontraron 16 mutaciones, de las cuales sólo 4 fueron constantes en más de dos secuencias. Al comparar conjuntamente los cuatro genotipos de bocavirus (HBoV1-4) se evidenció que la mayoría de las mutaciones ocurrían de igual manera para los dos grupos formados por los tipos HBoV2-HBoV4 y HBoV1-HBoV3. No se observó lo mismo al comparar la secuencia de NP1 (nucleótidos 2410 a 3069), común a todas las especies de bocavirus, encontrándose distintas mutaciones para la misma posición en las cuatro especies y reflejando así una mayor variabilidad intergenotípica. Estos detalles registrados a partir del análisis de la distancia genética (basada en la ocurrencia de mutaciones puntuales entre las cepas comparadas) concuerdan con la teoría de la evolución de HBoV3 propuesta por Arthur y colaboradores⁽³¹⁾. En este y otro trabajo posterior⁽³²⁾, el alineamiento de las secuencias de HBoV1, HBoV2 y HBoV3 llevó a identificar potenciales puntos de entrecruzamiento e intercambio genético entre HBoV1 y HBoV2. La interpretación de este resultado en el contexto de la detección de ambas especies en el tracto entérico⁽³³⁾ da lugar a la hipótesis de que la coinfección de un individuo por HBoV1 y HBoV2 podría haber dado lugar a eventos de recombinación, generando así una nueva especie, HBoV3, a partir de cepas ancestrales de HBoV1 y HBoV2.

El cotejo del fragmento NP1 entre miembros del grupo HBoV1 reflejó una alta homología, hallándose sólo 7 mutaciones puntuales. La relevancia de esta información radica en su significado en el contexto diagnóstico, ya que cuando se busca identificar las especies infectantes en muestras clínicas NP1 suele ser el sitio de elección para realizar detección y genotipificación por ser característica del género Bocavirus, y un alto número de mutaciones en esta región podría dificultar el resultado.

Por otro lado, la comparación de los fragmentos correspondientes a VP1/VP2 (nucleótidos 3056 a 5071) arrojó una alta variabilidad tanto intraespecífica como interespecífica; esta es la región con mayor número de mutaciones identificadas entre las distintas cepas de HBoV1⁽⁴²⁾, sin embargo, solo 7/42 (17%) fueron constantes en más de dos secuencias distintas. El valor de estas mutaciones radica en la importancia que tienen VP1/VP2 en la neutralización viral, al portar determinantes antigénicos que son reconocidos por los receptores del sistema inmune y anticuerpos del hospedador⁽³⁴⁾. De manera semejante a lo observado en nuestro estudio, trabajos previos reflejan la mayor variabilidad genética intraespecífica en la región VP1/VP2⁽²³⁾.

Por último, cabe remarcar que el análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de la cepa AR09_307 y la secuencia originalmente descubierta por Allander y colaboradores en Suecia (2005), DQ000495, evidenció sólo 22 mutaciones, de las cuales 5 correspondieron a NS1, 1 a NP1 y 16 a VP1/VP2. Esto demuestra la elevada estabilidad genética de HBoV1, lo que podría encuadrarse en la función correctora de errores de la polimerasa y en el escaso margen codificante de su pequeño genoma -la ausencia de secuencias funcionales redundantes hace que las mutaciones que interfieren con las funciones esenciales de adsorción, penetración, desnudamiento, replicación, ensamble y liberación sean rápidamente perdidas de la población viral⁽³⁵⁾. Al mismo tiempo, contrasta con la mayor tasa evolutiva esperada para virus con genomas pequeños de cadena simple⁽³⁶⁾. Dilucidar estas cuestiones requiere profundizar los estudios referentes a la evolución molecular de los bocavirus.

En conclusión, se contribuye con un aporte significativo al estudio de la biología molecular de HBoV1 en nuestro medio, con perspectivas de utilizar esta información tanto en investigación como en desarrollos tecnológicos de aplicación diagnóstica en la práctica médica.

Agradecimientos y conflictos de interés

Este estudio fue realizado con subsidios otorgados por Fundación A. J. Roemmers 2012-2014 y SECYT-UNC 2014-2015 (05/H363-RR 1565/2014). Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. WHO (World Health Organization). Children: reducing mortality. Fact sheet N°178. Updated September 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/>
2. Nichols WG, Peck Campbell AJ, Boeckh M. Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:274-290.
3. Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, Pozzetto B. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol.* 2014;60:402-407.
4. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12891-12896. Errata en *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15712.
5. Mansbach JM, Camargo CA Jr. Respiratory viruses in bronchiolitis and their link to recurrent wheezing and asthma. *Clin Lab Med.* 2009;29:741-755.
6. Moreno L, Eguizábal L, Ghietto LM, Bujedo E, Adamo MP. Human bocavirus respiratory infection in infants in Córdoba, Argentina. *Arch Argent Pediatr.* 2014;112:70-74.
7. Wasinger NS, Marchesi A, Cardozo Tomas A, Ghietto LM, Equizabal L, Kohn V, Arroyo F, Ferreyra Soaje P, Marques I, Bracciaforte R, Moreno L, Adamo MP. Human Bocavirus 1: agent of pneumonia in healthy infants with first and subsequent episodes of lower respiratory tract infection. *J Med Microbiol.* JMM-D-15-00598.
8. Bicer S, Giray T, Çöl D, Erdağ GÇ, Vitrinel A, Gürol Y, Çelik G, Kaspar C, Küçük Ö. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr* 2013;39:22.
9. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Margaret A, Zerr DM, Wald A, Englund JA. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis.* 2010;201:1625-1632.
10. Zuccotti G, Dilillo D, Zappa A, Galli E, Amendola A, Martinelli M, Pariani E, Salvini F, Tanzi E, Riva E,

- Giovannini M. Epidemiological and clinical features of respiratory viral infections in hospitalized children during the circulation of influenza virus A(H1N1) 2009. *Influenza Other Respir Viruses.* 2011;5:e528-e534.
11. Shen J, Zhu Q, Zeng M, Yu H. Detection and genome analysis of human bocavirus 1-4 from hospitalized children with acute lower respiratory tract infection and symptoms of wheezing in Shanghai. *Int J Mol Med.* 2013;32:1415-1420.
12. Chen YW, Huang YC, Ho TH, Huang CG, Tsao KC, Lin TY. Viral etiology of bronchiolitis among pediatric inpatients in northern Taiwan with emphasis on newly identified respiratory viruses. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014;47:116-121.
13. Ghietto LM, Camara A, Camara J, Adamo MP. High frequency of Human Bocavirus 1 DNA in infants and adults with lower acute respiratory infection. *J Med Microbiol* 2012a;61:548-551.
14. Ghietto LM, Cámara A, Zhou Y, Pedranti M, Ferreyra S, Frey T, Cámara J, Adamo MP. High prevalence of Human Bocavirus 1 (HBoV1) in infants with bronchiolitis and pneumonia in Argentina, 2007-2009. *Braz J Infect Dis* 2012b;16:38-44.
15. Ghietto LM, Majul D, Ferreyra Soaje P, Baumeister E, Avaro M, Insfrán C, Mosca L, Cámara A, Moreno LB, Adamo MP. Co-morbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory Human Bocavirus infection. *Arch Virol.* 2015;160:117-127.
16. Guo L, Wang Y, Zhou H, Wu C, Song J, Li J, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, Wang J, Hung T. Differential seroprevalence of human bocavirus species 1-4 in Beijing, China. *PLoS One.* 2012;7:e39644.
17. Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Simell S, Mykkänen J, Korpelainen J, Ruuskanen O, Ilonen J, Knip M, Simell O, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Association of human bocavirus 1 infection with respiratory disease in childhood follow-up study, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:264-267.
18. Proença-Modena JL, Gagliardi TB, Paula FE, Iwamoto MA, Criado MF, Camara AA, Acrani GO, Cintra OA, Cervi MC, Arruda LK, Arruda E. Detection of human bocavirus mRNA in respiratory secretions correlates with high viral load and concurrent diarrhea. *PLoS One.* 2011;6:e21083.
19. Abdel-Moneim AS, Kamel MM, Al-Ghamdi AS, Al-Malky MI. Detection of bocavirus in children suffering from acute respiratory tract infections in Saudi Arabia. *PLoS One.* 2013;8:e55500.

20. Deng Y, Gu X, Zhao X, Luo J, Luo Z, Wang L, Fu Z, Yang X, Liu E. High viral load of human bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection. *PLoS One*. 2012;7:e34353.
21. Zhao B, Yu X, Wang C, Teng Z, Wang C, Shen J, Gao Y, Zhu Z, Wang J, Yuan Z, Wu F, Zhang X, Ghildyal R. High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. *PLoS One*. 2013;8(4):e62318.
22. Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. *J Infect Dis*. 2015;212:516-524.
23. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser J, Bartkus J, Delwart E. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *Pediatr Infect Dis J* 2010;201:1633-1643.
24. Koseki N, Teramoto S, Kaiho M, Gomi-Endo R, Yoshioka M, Takahashi Y, Nakayama T, Sawada H, Konno M, Ushijima H, Kikuta H, Ariga T, Ishiguro N. Detection of human bocaviruses 1 to 4 from nasopharyngeal swab samples collected from patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2118-2121.
25. López-Bueno A, Villarreal LP, Almendral JM. Parvovirus variation for disease: a difference with RNA viruses? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;299:349-370.
26. Chen AY, Cheng F, Lou S, Luo Y, Liu Z, Delwart E, Pintel D, Qiu J. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology*. 2010;403:145-154.
27. Ahn JG, Choi SY, Kim DS, Kim KH. Human bocavirus isolated from children with acute respiratory tract infections in Korea, 2010-2011. *J Med Virol*. 2014;86:2011-2018.
28. Pogka V, Moutousi A, Kossyvakis A, Kalliaropoulos A, Sgouras DN, Giannaki M, Mentis AF. Genetic variability of human metapneumo- and bocaviruses in children with respiratory tract infections. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8:107-115.
29. Xu L, He X, Zhang DM, Feng FS, Wang Z, Guan LL, Wu JH, Zhou R, Zheng BJ, Yuen KY, Li MF, Cao KY. Surveillance and genome analysis of human bocavirus in patients with respiratory infection in Guangzhou, China. *PLoS One*. 2012;7:e44876.
30. ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2014 Release*. EC 46, Montreal, Canada, July 2014, email ratification 2015 (MSL #29). <http://www.ictvonline.org/virus-Taxonomy.asp>
31. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000391.
32. Chieochansin T, Simmonds P, Poovorawan Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Arch Virol*. 2010;155:2023-2028.
33. Chieochansin T, Thongmee C, Vimolket L, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:479-481.
34. Gurda BL, Parent KN, Bladec H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, Castro A, McKenna R, Olson N, Brown K, Baker TS, Agbandje-McKenna M. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J Virol*. 2010;84:5880-5889.
35. Fleischmann WR Jr. *Viral Genetics*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8439/>
36. Sanjuán R. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002685.