

Klinik Olarak Parvovirus B19 İnfeksiyonu Ön Tanılı Olguların Virolojik Takibi

Nilgün IŞIK(*), Ebru SABAHOĞLU(*), D.Murat IŞIK(**), Sema ANAK(***),
Ali AĞAÇFİDAN(*), Emel BOZKAYA(*)

(*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul.

(**)Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

(***) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Human Parvovirus B19 (B19) tüm dünyada yaygın olarak görülen, asemptomatik bir infeksiyon etkenidir. B19 Eritema İnfeksiyozum tablosu ile birlikte, kronik hemolitik anemili hastalarda aplastik kriz, artropati, nötropeni, trombositopeni ve fetal infeksiyonlara da yol açabilmektedir.

Bu çalışmada 15 yaş altı çocuklarda (s=126) ve 20 yaş üstü erişkinlerde (s=44) B19 infeksiyonu tanısı amacıyla B19 özgül IgG ve IgM antikorları oranlarının belirlenmesi ve B19 özgül IgM antikorları pozitif bulunan hastaların Real-time PCR ile B19 DNA'sının ölçülmesi amaçlanmıştır. Serum örnekleri Parvovirus B19 IgG/IgM kiti (Focus, USA) ile Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle taranmıştır. DNA miktarları ise LightCycler – Parvovirus B19 Quantification kiti (Roche, Germany) ile Real-time PCR yöntemiyle saptanmıştır. B19 özgül IgM antikorları 13 hastada pozitif bulunurken, bu hastalarda B19 DNA, farklı oranlarda Real-time PCR ile pozitif bulunmuştur.

B19 antikor oranları; 15 yaş altı çocuklarda IgG %26.9, IgM %9.5 ve 20 yaş üstü erişkin grubunda IgG %54.5 ve IgM %2.2 oranında bulunmuştur. Seroprevalansla ilgili daha güvenilir sonuçlar alınması için çok sayıda hasta ve değişik yaş gruplarında çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: İnsan Parvovirus B19, seroprevalans, ELISA, Real-time PCR

SUMMARY

Follow up of Patients Pre-Diagnosed as Parvovirus B19 Infection

Human Parvovirus B19 (B19) infection is common worldwide, but is often asymptomatic. B19 can cause, besides Erythema Infectiosum, aplastic crisis in patients with chronic hemolytic anemia, arthropathy, neutropenia, thrombocytopenia, fetal infections.

The aim of this study was to determine the rates of Parvovirus B19 specific IgG and IgM antibodies in children <15 years of age (n=126) and >20 years of adults (n=44) and to determine B19 DNA amounts in B19 specific IgM antibody positive patients by Real-time PCR. The sera were screened for the virus using Parvovirus B19 IgG/IgM kit (Focus, USA) with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. B19 DNA amounts were determined using LightCycler - Parvovirus B19 Quantification kit (Roche, Germany) by Real-time PCR method. B19 specific IgM antibody were found positive in 13 patients and different amounts of B19 DNA were found positive with Real-time PCR in these patients.

The B19 specific antibodies rates was 26.9% for IgG and 9.5% for IgM in children <15 years of age and 54.5% for IgG, 2.2% for IgM in >20 years of adults. For taking accurate results about seroprevalence it must be done more studies including much more number of patients of different age groups.

Key words: Human Parvovirus B19, seroprevalence, ELISA, Real-time PCR

GİRİŞ

Bilinen en küçük DNA virusu olan Human Parvovirus B19 (B19), 18-26 nm çapında, zarfsız bir mikroorganizmadır. Parvovirus genomu lineer, tek

sarmallı, molekül ağırlığı 1.5-1.8 x10⁶ dalton olan DNA molekülü içerir. İki yapısal (VP1 ve VP2), bir de yapısal olmayan (NS-1) proteini bu genomca kodlanmaktadır.

Virusla infekte olduğunda en sık görülen klinik tablo "Eritema İnfeksiyozum"dur. Ayrıca geçici

İletişim : Nilgün Işık
e-posta nilis01@yahoo.com

aplastik kriz, herediter hemolitik anemi, fetal infeksiyonlar, nötropeni, trombositopeni ve geçici artrite de neden olabilir. Virus özellikle eritroid progenitör hücrelerde replikasyon yapar. Hastalığın en yaygın bulaşma yolu solunum sekresyonları ve yakın temasla olmaktadır. Ayrıca kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu yoluyla da bulaş söz konusudur(1-4).

Parvovirus infeksiyonlarının tanısı serumda B19 özgül IgG ve IgM antikorlarının veya viral DNA'nın saptanmasıyla konulmaktadır(5-7). Çalışmamızda 15 yaş altı çocuklar ve 20 yaş üstü erişkinlerde B19 özgül IgG ve IgM antikorları oranlarını ve IgM pozitif örneklerde Real-time PCR ile DNA miktarlarının, belirli aralıklarla takiplerinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Parvovirus B19 infeksiyonu ön tanısı olan ve laboratuvar incelemesi için gönderilen 15 yaş altı 126 çocuk (50 kız, 76 erkek) ile 20 yaş üzeri 44 (27 kadın, 17 erkek) olgu alınmıştır. Olguların her birinden alınan 3 ml kan örneğinden serumlar ayrılarak B19 özgül IgG/IgM antikorları ELISA yöntemiyle (Parvovirus B 19 IgG/IgM kiti, Focus,USA) kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Ayrıca B19 özgül IgM antikorları pozitif bulunan hastaların serum örneklerinden DNA izolasyonu High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche, Germany) ile yapılmıştır. Real-time PCR ile B19 miktar tayinleri Light cycler-Parvovirus B 19 Quantification kiti (Roche, Germany) ile yapılmıştır. B19 özgül IgM antikorlarını pozitif bulduğumuz 13 hastadan (akut infeksiyonlu), IgM antikorları negatifleşene kadar 10 hafta süre ile alınan kan örneklerinde IgM antikorları ve Real-time PCR ile DNA miktarları ölçülmüştür. Böylece, IgM antikor titreleri negatifleşen hastalarda, DNA miktarlarının halen pozitif olup olmadığı değerlendirilmiştir.

DNA izolasyonu :

Kan örneklerinden ayrılan serumdan 200 ml alınarak üzerine 200 µl Poly A içeren solüsyon ve 50 µl

proteinaz K ilave edilerek karışım 72°C'de 10 dk inkübe edilmiştir ve çözelti kit (High Pure Viral Nucleic Acid kiti,Roche, Germany) içinden çıkan filtrelili tüplere boşaltılmıştır. Tüpler 8000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra inhibitör uzaklaştırma çözeltisi ve yıkama solüsyonları ilave edilerek tekrar aynı devirde santrifüj edilmiştir. En son filtrelili tüpler üzerine 50 µl sulandırma çözeltisi ilave edilerek santrifüj edilmiş ve ependorf tüplerinde toplanan DNA'lar -80°C'de Real-time PCR yapılana kadar saklanmıştır.

Real-time PCR :

DNA miktar tayini Real-time PCR ile LightCycler – Parvovirus B19 Quantification kiti (Roche, Germany) kullanılarak yapılmıştır. PCR'da B19 DNA'sına spesifik fluoressan boyalı primerler kullanılmıştır. Bir probun 5' ucu LightCycler Red 640, diğer probun 3' ucu fluorescein ile işaretlidir. Yöntem, iki farklı fluoressan boya işaretli oligonükleotid ve amplifikasyon yapılacak ürün bulunan ortamda, oligonükleotidler birbirine iyice yaklaşınca (1-5 bp) bir enerji yaymasına ve bu enerji etkisiyle LightCycler Red 640'ın fluorescein ile birleşmesi anında daha uzun dalga boylu bir ışın yayılması esasına dayanır. Bu ışın 640 nm'de ölçülür ve bu olaya Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) denir. Ayrıca PCR'da kite spesifik internal kontrolde kullanılmaktadır. Hasta sonuçları kit standartlarının (10²-10⁶ kopya/reaksiyon) oluşturduğu grafikten yararlanılarak, kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 15 yaş altı çocuklardan (s=126) alınan serum örneklerinin 34'ünde (%26.9) IgG ve 12'sinde (%9.5) IgM pozitif saptanmıştır. 20 yaş üstü erişkin grubu (s=44) serum örneklerinin 24'ünde (%54.5) IgG ve birinde (%2.2) IgM pozitif bulunmuştur. Bu iki grup içinde IgM pozitif bulunan 13 hastanın B19 DNA miktarları Real-time PCR ile pozitif bulunmuştur. Daha sonra IgM pozitif bulunan bu 13 hastadan birer hafta aralıklarla alınan kan örneklerinde ELISA ile IgM antikorları ve Real-time PCR ile DNA miktarları, olgularda IgM antikorları negatif bulunana kadar araştırılmıştır. Sonuçta dört

hastada 5. haftada, altı hastada 7. haftada ve üç hastada 9. haftada IgM antikorları negatif bulunmuştur. 10. haftada alınan kan örneklerinde hastaların tümünün IgM antikorları negatif olmasına rağmen Real-time PCR ile DNA miktarları düşük titrede pozitif bulunmuştur.

Tablo 1'de B19 infeksiyonlu (s=13; IgM (+), IgG (+), DNA (+)) olgulardan, birer hafta aralıklarla (10 hafta süreyle) alınan kan örneklerindeki IgM antikorları ve DNA sonuçları gösterilmiştir. Bu hastalarda B19 özgül IgG antikorları 10 hafta süre ile alınan tüm örneklerde pozitif bulunmuştur.

Tablo 1. B19 infeksiyonlu hastaların belirli aralıklarla alınan kan örneklerindeki B19 IgM antikorları ve DNA sonuçları

| Hasta No | 1. – 5. Hafta | | 6. Hafta | | 7. – 8. Hafta | | 9. – 10. Hafta | |
|----------|---------------|---------|-----------|---------|---------------|---------|----------------|---------|
| | Sonuçları | | Sonuçları | | Sonuçları | | Sonuçları | |
| | B19 DNA | B19 IgM | B19 DNA | B19 IgM | B19 DNA | B19 IgM | B19 DNA | B19 IgM |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 2 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 3 | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 5 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 6 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 7 | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 9 | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 10 | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 11 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 12 | + | + | + | + | + | - | + | - |
| 13 | + | + | + | + | + | - | + | - |

Onüç hastanın ortalama DNA miktarları; 1. – 3. haftalar arası 10^6-10^5 kopya/reaksiyon, 4. – 5. haftalar arası 10^4-10^3 kopya/reaksiyon, 6. – 10. haftalar arası 10^2-10^1 kopya/reaksiyon arasında bulunmuştur.

TARTIŞMA

B19 infeksiyonu en sık okul çağı çocuklarda (5-15 yaş) görülse de tüm yaş gruplarında görülebilir. Erişkinlerin %65'i İnfeksiyon geçirmiştir (8). B19 prevalansı sağlıklı kadınlarda %57.8, gebe kadınlarda ise %65 olduğu bildirilmiştir (9,10). Almanya'da yapılan bir çalışmada gebe kadınlarda B19 prevalansı %29 bulunmuştur (11). Kuveyt'te yapılan bir çalışmada gebe kadınlarda 3. trimestr'da parvovirus B19 prevalansı %16.5 olduğu, ayrıca 1. ve 2. trimestr gebeliklerde IgG prevalansının 3. trimestr'a göre yüksek olduğu bildirilmiştir (12). Sodja ve ark. (13) tarafından Çekoslavakya'da yapılan bir çalışmada B19 IgG prevalansı 0-4 yaş grubu çocuklarda %9.8,

5-14 yaş grubu çocuklarda %27-35.7 ve 15 yaş üzerinde ise %53.3-57.7 olarak bildirilmiştir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada 1-5 yaş grubu çocuklarda prevalans %37 ve 50 yaş üzeri grupta ise %87 olarak saptanmıştır (14).

Alsaeid ve ark. (15) Kuveyt'te yaptıkları çalışmada IgG prevalansı 2-16 yaş grubunda %17.4 olarak saptamışlardır. Tayland'da B19 prevalansının çocuklarda ortalama %20.1, Hindistan'da ise B19 prevalansı 1-5 yaş grubu çocuklarda %8.9, 15 yaş üzeri grupta ise %70 olarak bildirilmiştir (16,17).

Çalışmamızda B19 özgül IgG antikor oranları, 15 yaş altı çocuklarda %26.9, 20 yaş üstü grupta ise %54.5 olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız diğer ülke

sonuçları ile karşılaştırıldığında, başta Çekoslovakya olmak üzere elde edilen sonuçların birbirine yakın değerler olduğu görülmüştür. Prevalansın yaşla orantılı olarak arttığı, risk gruplarına göre ve hastaların immun durumlarına göre değiştiği bilindiğinden bu durumlara bağlı olarak, detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır(16). Bu sebeplerden dolayı, ülkemizdeki B19 prevalansının belirlenmesi için çok sayıdaki örnek ve sınıflandırılmış yaş gruplarında daha detaylı çalışmaların yapılmasının belirleyici olacağını düşünmekteyiz.

B19 tanısında, özgül IgG ve IgM antikorlarının taranmasının yanı sıra PCR sistemlerine dayalı yöntemlerle B19 DNA miktar tayinleri de tanı koydurucudur. B19 tanısına yönelik yapılan çalışmalarda, özellikle son yıllarda Real-time PCR ve diğer PCR sistemlerine dayalı yöntemler kullanılarak, hızlı tanıya gidilebileceğine ilişkin çalışmalar bildirilmiştir. Manaresi ve ark. (5) yaptıkları bir çalışmada, Real-time PCR ile serumda B19 DNA miktar tayininin, B19 enfeksiyonunun hızlı tanısında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Real-time PCR sistemi ile reinfeksiyon görülen immünsüprese çocuklarda vireminin kantitatif olarak ölçülmesinin tedavilerin planlanmasında yararlı olacağı vurgulanmıştır (7). Diğer bir çalışmada ise yanlış negatif sonuçların alınmasını engellemek için, Real-time PCR yönteminin kullanılabileceği bildirilmiştir (18). Aberhan ve ark. (19) özellikle kan ve plazma ürünlerine Real-time PCR ile B19 DNA miktar tayini yapılmasının gerekliliğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, B19 özgül IgG ve IgM antikor titrelerini pozitif bulduğumuz 13 hastanın serum örneklerinde Real-time PCR ile DNA miktar tayini yapılmış ve tamamı yüksek titrede pozitif bulunmuştur. Bu hastaların birer hafta aralıkla alınan 10 örneğinde IgM antikorları 9. haftada negatif bulunurken, DNA miktarları 10. haftada halen düşük titrede pozitif bulunmuştur. Sonuçta B19 enfeksiyonu tanısıyla ilgili olarak, özgül IgM antikorları negatif bulunsada dahi B19 özgül DNA miktar sonuçları pozitif bulunabilmektedir. Bu nedenle antikor yanıtı yetersiz immun yetmezlikli

hastalarda DNA miktarlarının Real-time PCR ile test edilmesinin yararlı olabileceği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- 1. Anderson MJ:** Human Parvoviruses, “ Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR (eds): Principles and Practice of Clinical Virology”. p 507-16. John Willey, New York (1987).
- 2. Clewley JP:** PCR detection of Parvovirus B19, “Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. ” p367-72, American Society for Microbiology, Washington DC (1993).
- 3. Krugman S, Katz S, Wilford C, Gershon A:** Infectious Disease of Children, p 326-34, 9th ed. Mosby, St Louis (1998).
- 4. Fridell E, Cohen BJ, Wahren B:** Evaluation of a synthetic-peptide enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M to human parvovirus B19. J Clin Microbiol 29:1376 (1991).
- 5. Manaresi E, Gallinella G, Zuffi E, Bonvicini F, Zerbini M, Musiani M:** Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. J Med Virol 67:275 (2002).
- 6. Saito T, Munakata Y, Fu Y, et al:** Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. J Virol Methods 107:81 (2003).
- 7. Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, et al:** New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. J Clin Microbiol 39:4413 (2001).
- 8. McClure WR:** Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Ann Rev Biochem 54:171(1985).
- 9. Kyriazopoulou V, Simitopoulou M, Bondis J, Diza E, Athanasiadis A, Frantidou F, Souliou E:** Human parvovirus B19: immunity of Greek females and prenatal investigation of hydrops fetalis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 74:157 (1997).
- 10. Valeur-Jensen AK, Pedersen CB, Westergaard T, Jensen IP, Lebech M, Andersen PK, Aaby P, Pedersen BN, Melbye M:** Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy. JAMA 281:1099 (1999).
- 11. Friese K, Beichert M, Hof H, Weikel W, Falke D, Sickinger R, Melchert F:** Incidence of congenital

infections. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 51:890 (1991).

12. Makhseed M, Pacsa A, Ahmed MA, Essa SS: Pattern of parvovirus B19 infection during different trimesters of pregnancy in Kuwait. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7:287 (1999).

13. Sodja I, Mrazova M, Smelhausova M, Kotrbova K, Pazdiora P, Bruj J, Stojanov I, Kadlecik D, Samal J: Seroprevalence of IgG antibodies against parvovirus B19 in the population of the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 44:171(1995).

14. Heegaard ED, Petersen BL, Heilmann CJ, Hornsleth A: Prevalence of parvovirus B19 and parvovirus V9 DNA and antibodies in paired bone marrow and serum samples from healthy individuals. *J Clin Microbiol* 40:933 (2002).

15. Alsaeid K, Alsaeid M, Essa S, Dimitrov D, Pacsa A:

Seroprevalence of human parvovirus B19 in children of a desert region. *Ann Trop Paediatr* 16:255 (1996).

16. Poovorawan Y, Theamboonlers A, Suandork P, Hirsch P: Prevalence of antibodies to parvovirus B 19 in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31:422 (2000).

17. Abraham M, Rudraraju R, Kannangai R, George K, Cherian T, Daniel D, Ramalingam S, Sridharan G: A pilot study on the seroprevalence of parvovirus B19 infection. *Indian J Med Res* 115:139 (2002).

18. Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hammerle T: Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol* 67:2837 (2001).

19. Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M: A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods* 92:183 (2001).