

İnsan Parvovirus B19 İnfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Nilgün IŞIK(*), Ali AĞAÇFİDAN(*)

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

ÖZET

İnsan Parvovirus B19 (HPVB19) immun sistemi baskılanmış hastalarda nötropeni ve kronik anemilere, fetal ölümlere, hemolitik anemili hastalarda aplastik krizlere, yetişkinlerde kronik artrite, ayrıca eritema infeksiyozumu da içeren birçok sendroma sebep olmaktadır. Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda HPVB19 infeksiyonlarının hızlı tanısı çok önemlidir. Son zamanlarda geliştirilen moleküler biyoloji yöntemleri ile tanı kolaylaşmıştır.

Anahtar kelimeler: İnsan Parvovirus B19, moleküler biyoloji yöntemleri

SUMMARY

Molecular Biological Methods in Diagnosis of Human Parvovirus B19 Infections

Human parvovirus B19 (HPVB19) causes several syndromes, including erythema infectiosum, chronic arthritis in adults, aplastic crisis in patient with hemolytic anemia fetal death and chronic anemia and neutropenia in immunosuppressed patients. The rapid diagnosis of HPVB19 infections is important, especially in immunosuppressed patients. The diagnosis has become easier by molecular biological methods which have been developed lately.

Key words: Human parvovirus B19, molecular biological methods

GİRİŞ

İnsan Parvovirus B19 (HPVB19) ilk kez 1975'te İngiltere'de Cossart ve ark. (1) tarafından tanımlanan küçük bir DNA virusudur. Latince küçük anlamına gelen "parvus" kelimesinden türetilmiştir. Omurgasızlarda (böceklerde) infeksiyon yapan Densovirus, omurgalılarda (kuşlarda) infeksiyon yapan Dependovirus'la birlikte Parvovirus adı altında Parvoviridae ailesine aittir. Parvovirus cinsine, insanlara infektif B19, köpeklere infektif Canine Parvovirus (CPV), kedilere infektif Feline Panleukopenia Virus (FPV) dahildir. İnsanlarda patojen olan yalnızca HPVB19'dur.

Parvoviridae ailesine ait viruslar ikozahedral, kapsüllü (32 kapsomerli), zarfsız, yaklaşık 20 nm çapındadırlar. Bu viruslar alkol, eter, kloroform ve 56°C sıcaklığa 60 dk'dan daha fazla dayanabilirler. Parvovirus genomu lineer, tek sarmallı, molekül ağırlığı 1.5-1.8x10⁶ Dalton olan DNA molekülü içerir. İki yapısal (VP1 ve VP2) ve bir yapısal olmayan (NSP) proteini bulunmaktadır. VP1

ve VP2 proteinleri kapsid yapısında yer almakta olup, VP2 major komponenttir. Virus replikasyon için eritropoietik hücreleri tercih eder. Parvoviruslar genelde bölünen hücreler replike olurlar ve eritroid progenitör hücrelerde litik reaksiyonlara yol açarlar (2,3).

HPVB19 tüm dünyada yaygındır. En sık okul çağı çocuklarında (5-15 yaş) görülse de tüm yaş gruplarında görülebilmektedir. Erişkinlerin %65'i HPVB19 infeksiyonu geçirmiştir. HPVB19 genellikle solunum sistemi kaynaklı sekresyonlarla bulaşmaktadır. Ev içi temas ve okul salgınları yaygındır. Kan ve kan ürünleri ile bulaş ayrıca pıhtılaşma faktör konsantreleri de yüksek bulaş riski taşımaktadırlar. Bu nedenle hemofili hastaları sık infekte olabilmektedirler. Aplastik kriz nedeniyle hastaneye kabul edilen hemolitik anemili hastalar viremik fazda olup, solunum yolları sekresyonlarında B19 virusu taşırlar dolayısıyla bulaştırıcıdırlar. Vertikal bulaş yoluyla hidrops fetalis görülebilmektedir. Gebelerde temasla fetal infeksiyon riski %33, fetal ölüm riski %9'dur. Virusla infekte olma durumunda

en sık gözlenen klinik tablo, genellikle çocuklarda, bazen de erişkinlerde görülen beşinci hastalık diye de adlandırılan eritema infeksiyozum tablosudur (4). Eritema infeksiyozum (5. hastalık): Daha çok çocuklarda görülür. 4-14 günlük inkübasyon dönemi sonrası ateş, titreme. Halsizlik, kas ağrıları ve kaşıntı gibi klinik belirtiler oluşur. IgM saptandıktan yaklaşık bir hafta sonra IgG'ler oluşur. İnfeksiyonun 17. gününden itibaren yanıklarda eritemli sanki tokatlanmış gibi görünen döküntüler, aynı zamanda da vücudun diğer bölümlerinde de görülebilir. Döküntüler 2-3 gün sonra sekelsiz kaybolur. Virus eritema infeksiyozum yanı sıra; B19 artropatisi, geçici aplastik kriz, bağışıklık yetmezliği olan hastalarda özellikle anemi ve trombositopeni, gebelerde ölü doğum, düşük ve hidrops fetalise yol açar.

Aşı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir, kültürde üretilmez. Korunma önlemleri özellikle kronik hemolitik anemisi olan, immun yetmezlikli hastalar ile bağışık olmayan gebelere uygulanmalıdır. Gebe sağlık personelinin bu hastalarla teması önlenmelidir. İntravenöz immunglobulin kullanımıyla immun yetmezlikli hastalarda, viremide azalma ve kırmızı hücre sayılarında artış görülmüştür. Tanı HPVB19 IgM ya da viral DNA saptanmasıyla olmaktadır. HPVB19 IgG ve IgM antikorlarının tespitinde ELISA ve RIA teknikleri, viral DNA saptanmasında ise moleküler biyoloji yöntemlerinden sıklıkla yararlanılmaktadır. PCR, hibridizasyon tekniklerinden daha duyarlıdır. Elektron mikroskopisiyle serum ve dokulardaki B19 virusu (viremik fazda) saptanabilmektedir. HPVB19 infeksiyonu tanısında kullanılan birçok yöntem vardır. Bu yöntemler kullanılarak ya antijen antikor tayini ya da viral DNA tayini yapılmaktadır (5-8).

Antijen ve Antikor Tayininde Kullanılan Yöntemler

İmmunoelektronmikroskopi (IEM) tekniği tanıda kullanılmakta ancak maliyeti yüksek aletler gerektirmektedir ve az sayıda klinik örneğin taranmasına elverişlidir. Bu nedenle antijen ve antikor tayininde sıklıkla ELISA ve RIA teknikleri kullanılmaktadır. Bazen Dot-Blot Hibridizasyon yöntemi de kullanılmaktadır. HPVB19'a özgül IgM antikorları, vireminin başlamasından yaklaşık 3-5 gün sonra IgG ise bir hafta sonra saptanabilir. HPVB19'a özgül IgM antikorları bir ay boyunca artmaya devam eder ve 1.5-3

ay içinde kaybolur. IgG ise hayat boyu serumda bulunur (5,6).

HPVB19 Tanısında Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Moleküler biyoloji yöntemleri ile serumdan, parafin preparatlardan, solunum sekresyonlarından, kemik iliğinden, dalak, amniotik sıvı ve çeşitli fetal organlardan HPVB19 DNA'sı saptanabilir. Moleküler biyoloji yöntemlerinden Dot-Blot Hibridizasyon yönteminde, tayin limiti en fazla 104 kopyadır. Bu da testin orta düzeyde viremi tayini yapabileceğini göstermektedir. Hibridizasyon ile saptama ELISA plaklarında yapılmakta ve bu yöntemin Dot-Blot Hibridizasyon testine göre daha spesifik olduğu bildirilmiştir. In Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği ile B19 virus lokalizasyon bölgeleri hücrelerde gösterilebilir. Özellikle infekte hücrelerde morfolojik yapı ve moleküler yapı işbirliği sağlanır. ISH özellikle kemik iliği hücrelerine, amniotik sıvı hücrelerine ve fetal doku örneklerine yapılmaktadır. Bu nedenle her örnekte HPVB19 DNA'sı araştırılmasına uygun değildir (3,6,9).

Bu teknikler göz önüne alındığında açıkça PCR, HPVB19 DNA tayininde en duyarlı yöntemdir. Her türlü örnek kullanılabilir. Tüm moleküler biyolojik yöntemlerde, kontaminasyonun önlenmesi için test sırasında uyulması gerekli kurallara (steril alet ve ortamların kullanılması, laminar kabinlerin kullanılması gibi rutin PCR laboratuvar önlemleri) dikkat edilmelidir. Hibridizasyon yöntemlerine göre PCR ile viremi uzun süreli takip edilebilir. Özellikle persistan infeksiyonlar ve maternal infeksiyonların tespitinde kullanılmaktadır. PCR ile kantitatif olarak DNA miktar tayini de yapılabilmektedir. HPVB19 DNA miktar tayininde kullanılan değişik PCR çeşitleri de bulunmaktadır. Bunlar; Single-Step PCR, Nested PCR, PCR-ELISA ve Real-time PCR'dır. Single-Step PCR, iki oligonükleotid primer kullanılarak tek aşamada işaretli internal proba hibridize olan hedef bölgenin çoğaltılmasına dayanır. Nested PCR'da, iki set "primer"da iki aşamalı PCR yapılarak daha spesifik bölgeler çoğaltılır, Nested PCR duyarlılığı tek basamaklı PCR'dan 10-100 kat fazladır. PCR-ELISA'da ise hibridizasyon aşaması ELISA plaklarında immunoenzimatik reaksiyonla gerçekleştirilir. Hedef ve internal standartlar aynı set "pri-

mer"la amplifiye edilir (3,6,9).

Real-time PCR sistemlerinde bugüne kadar yapılan çalışmalar HPVB19 DNA'sının kantitatif tayininde kullanılacak en duyarlı ve özgül test olduğunu göstermiştir. Testte kullanılan ekzojen internal kontrollele oluşabilecek yanlış negatif sonuçlar engellenmiş olur. Ayrıca testte miktarları bilinen standartlar kullanılarak ve amplifikasyonun her döngüsü monitörde takip edilebilmektedir. Testte kontaminasyon oranı diğer PCR'lara oranla çok daha azdır. Ayrıca sistemde sıcaklığı hızla arttırıp soğutma işlemi, ortam havasının ısıtılıp soğutulmasıyla olduğu için döngüler arası zaman çok kısadır ve böylelikle test sonuçları kısa sürede alınır. Testin değerlendirilmesi sırasında oluşmuş primer-dimer veya inhibisyonların alette görülebilmesi mümkündür. Ayrıca PCR döngü oranı testin herhangi bir anında arttırılabilir. Tüm bunlar Real-time PCR avantajlarıdır. Hem fetal hem maternal örnekler, kan ve kan ürünleri, plazma konsantreleri gibi çoklu örneklerin taranmasına uygun bir yöntemdir. HPVB19 infeksiyonlarının tanısında kullanılan tüm bu moleküler biyoloji testlerinin özellikleri yanı sıra tanıda en önemli etkenlerden biri de hastanın immun durumudur. Eğer sağlıklı kişi ise antikor yanıtı iyi olabileceğinden serolojik testler dahi tanıda çok önemlidir. Fakat immun yetmezlikli hastalarda bu durum daha farklıdır. Özellikle bu hasta gruplarında önemli komplikasyonlar (aplastik kriz, hemolitik anemi) olabildiğinden ve hastaların antikor yanıtları güçlü olmadığı için erken tanı amacıyla PCR kullanılmaktadır (3,6,9,10). HCV, HBV ve HIV gibi virusların, kan ve plazma taramalarında tespit edilmesi için geliştirilmiştir. Nükleik Asit Amplifikasyon Tekniği (NAT) ile kan ve plazma havuzlarında tarama yapılırsa pencere dönemindeki olası HCV, HBV ve HIV bulaşma riski %45-72 oranında azalır. NAT ile düşük viremler saptanabilir. Solvent deterjan yöntemi, ısıtma ile virusun dekontaminasyonu HCV, HBV, HIV için etkili, HPVB19 için etkisizdir. Çünkü HPVB19 ısıya dayanıklı ve zarfsız bir virustur. Pencere dönemi yoktur, akut faz çok kısadır. Bu nedenle, HPVB19 içinde kan ve plazma örneklerinde NAT yapılması önerilmektedir (İmmun suprese hastalar, transfüzyon yapılanlar, v.b.). HPVB19 DNA'sı 103 kopya/ml ise viremi geçebilir. <103 kopya/ml ise bulaştırıcı olmadığı bildirilmiştir (11,12).

HPVB19 İnfeksiyonları Tanısında Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri İle İlgili Yapılan Çalışma Örnekleri

HPVB19 infeksiyon şüpheli hastalardan alınan 95 serum örneği (anti-B19 IgM (+)) PCR ile test edilmiş %63 pozitiflik saptanmıştır (13).

PCR ve Dot-Blot Hibridizasyon testleri karşılaştırılmış B19 DNA tayininde PCR'ın 104 kez daha duyarlı olduğu saptanmıştır. PCR'da idrar, amniotik sıvı, plevral sıvı örnekleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, eğer tek serum örneğinde PCR çalışılacak ise serolojik testlerle desteklenmesi gerekliliği vurgulanmıştır (14).

HPVB19 infeksiyonlu hasta serum örnekleri ve kan mononükleer hücrelerinde Nested-PCR ile DNA tayini yapılmıştır. %70 örnek pozitif bulunmuştur. In Situ Hibridizasyon yöntemiyle mononükleer hücrelerde B19 lokalizasyonları tespit edilememiştir (15).

Özellikle immun yetmezlikli hastalarda hastalığa ait semptomlar antikor üretimi öncesinde görüle-bildiğinden, DNA tespitinin önemli olduğu vurgulanmaktadır. DNA tespitinin bu hastalarda immunglobulin tedavisine başlanabilmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (16).

Bir çalışmada kan ve kan ürünleri ile plazma pullarında HPVB19 DNA'sının araştırılması gerektiği ve rutin tanı testleri arasına girmesinin yararlarından bahsedilmiştir. Böylelikle tüm kan ve faktör ekstrilerinin PCR ile taranmasının gerekliliği vurgulanmıştır (17).

Real-time PCR ile HPVB19 DNA tayini yapılan bir diğer çalışmada örneklerin IgM ve IgG'lerin negatif olsa bile PCR ile DNA'ları tespit edilebilmiştir. PCR-ELISA testine göre Real-time PCR'ın beş kat daha hızlı sonuç verdiği, ayrıca PCR ile 4-6 ay boyunca DNA tayini yapılabileceği ve Real-time PCR tekniğinin HPVB19 laboratuvar tanısından kullanılacak en duyarlı ve özgül yöntem olduğu vurgulanmıştır (18).

HPVB19 DNA tayininde Real-time PCR kullanımıyla ilgili birçok çalışmada özellikle immun yetmezlikli hastalarda aşılama ve transfüzyon ile immunglobulin tedavilerinin uygulanabilmesi için virusun DNA'sının olmadığının tespitinin duyarlı ve özgül testlerle yapılması gerektiği bildirilmiştir (19).

Bultmann ve ark. (10) hematolojik hastalıkların birçoğundan sorumlu patojenlerden biri olarak HPVB19'u bildirmiş ve HPVB19 DNA tespitinde moleküler biyoloji yöntemlerinin önemini vurgulamışlardır.

Kan ve kan ürünleri, kemik iliği, plazma ekstratları gibi örnekler yapılan rutin tarama testleri arasında, HPVB19 DNA'sının moleküler biyoloji yöntemleriyle araştırılmasının gerekliliği, özellikle transfüzyon yapılan immunsuprese hasta guruplarında oluşabilecek reinfeksiyonları önleme açısından yararlı olacağı görülmektedir..

KAYNAKLAR

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D: Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1:72(1975)
2. Anderson MJ: Human Parvoviruses. "AJ Zuckerman, JE Banatvala, JR Pattison (eds): Principles and Practice of Clinical Virology", p507 John Willey, New York (1987).
3. Clewley JP: PCR detection of Parvovirus B19. "DH Persing, TF Smith, FC Tenover, TJ White (eds): Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications", p367-72. American Society for Microbiology, Washington DC (1993).
4. Krugman S, Katz S, Wilford C, Gershon A: Infectious Disease of Children, p326-34, 9th ed. Mosby, St Louis (1998).
5. 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).
6. Clewley JP, Cohen BJ: Investigation of human parvovirus B19 infection using PCR. "JP Clewley (ed): The Polymerase Chain Reaction (PCR) for Human Viral Diagnosis", p205-215, CRC Press, London (1995).
7. 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).
8. 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).
9. Zerbini M, Gallinella G, Cricca M, Bonvicini F, Musiani M: Diagnostic procedures in B19 infection. *Pathol Biol* 50:332 (2002).
10. Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Kandolf R: Parvovirus B19: a pathogen responsible for more than hematologic disorders. *Virchows Arch* 442:8 (2003).
11. Tabor E, Epstein JS: NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. *Transfusion* 42:1230 (2002).
12. Brown KE, Young NS, Alving BM, Barbosa LH: Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion* 41:130-5 (2001).
13. Clewley JP: Polymerase chain reaction assay of parvovirus B19 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 27:2647(1989).
14. Koch WC, Adler SP: Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:65 (1990).
15. Patou G, Pillay D, Myint S, Pattison J: Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J Clin Microbiol* 31:540 (1993).
16. Hicks KE, Beard S, Cohen BJ, Clewley JP: A simple and sensitive DNA hybridization assay used for the routine diagnosis of human parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol* 33:2473 (1995).
17. Aubin JT, Defer C, Vidaud M, Maniez Montreuil M, Flan B: Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang* 78:7 (2000).
18. 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).
19. Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, Beutel K, Schmitt HJ, Ullmann U, Rautenberg P: 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).