

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİBYA 'DA BÖBREK NAKLİ OLMUŞ HASTALARIN
PARVOVİRUS B19 (PVB19) TESPİTİNDE ELISA
SONUÇLARININ REAL-TİME PCR İLE DOĞRULANMASI**

Musbah Emhamed Farag ALMBSUOT

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Bayram KIRAN
Doç. Dr. Mahmut GÜR
Dr. Öğr. Üyesi Kerim GÜNEY
Doç. Dr. Aytaç GÜDER
Doç. Dr. Ümit CEYLAN**

**DOKTORA TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Musbah Emhamed Farag ALMABSUOT tarafından hazırlanan " **Libya 'da Böbrek Nakli Olmuş Hastaların Parvovirus B19 (PVB19) Tespitinde ELISA Sonuçlarının Real-Time Pcr İle Doğrulanması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Bayram KIRAN
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mahmut GÜR
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Kerim GÜNEY
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Aytaç GÜDER
Giresun Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ümit CEYLAN
Giresun Üniversitesi



24/12/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

Musbah Emhamed Farag ALMABSUOT



ÖZET

Doktora Tezi

LİBYA 'DA BÖBREK NAKLİ OLMUŞ HASTALARIN PARVOVİRUS B19 (PVB19) TESPİTİNDE ELISA SONUÇLARININ REAL-TİME PCR İLE DOĞRULANMASI

Musbah Emhamed Farag ALMBSUOT
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bayram KIRAN

Tek zincirli bir DNA virüsü olan B19, Parvoviridia familyasına aittir ve sadece insanda patojen olduğu bilinir. İnsanda özellikle organ nakli alıcıları gibi immün baskılanmış hastalarda birçok soruna neden olur. Böbrek nakli hastalarında parvovirüs B19, immün yanıtın başarısızlığından dolayı yıllarca devam edebilir, anemi ve başka bir retikülonitopeni gibi kronik klinik belirtilerle ilişkili olabilir.

Libya'da iki ana böbrek nakli merkezinde (Tripoli Central Hospital- General Hawari Hospital) 2017 Ocak ayından 2017 Aralık ayına kadar olan periyotta kontrol edilen yaşları 12-64 arasında değişen 50 böbrek nakli hastasından (10 kadın-40 erkek) 5 mL kan örneği alındı. Numunelere 3000 RPM'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve serumu alındı. Alınan serumlar analize kadar -20 °C'de dondurularak saklandı. Numuneler hastaların yaş, cinsiyet, kanın alım tarihi, kullandıkları immün süpresif ilaçlar, tıbbi öyküleri gibi bilgilerle desteklendi. Tüm numuneler, Parvovirus B19 IgM'ye karşı tespit antikoru ve dolaylı ELISA prensiplerine bağlı olarak parvovirus B19 IgG'ye karşı antikor için enzim bağlı immünosorbent tahlil tekniği (ELISA) ile analiz edildi. Pozitif sonuçlar, RT-PCR ile doğrulandı.

Parvovirus B19 oranının seropozitifliği, IgM (akut enfeksiyon) için 3/50 (%6) ve IgG (kronik enfeksiyon) için 34/50 (%66) idi. Libya böbrek naklinde Parvovirus B19'un seropozitifliği (Her iki IgM, IgG) yaşa bağlıdır; etkilenen yaş, 20-39 yaş arasındaydı. Tüm IgM sonuçları pozitif iken, 20 örnekten 6 BN pozitif seçildi.

Sonuç, Libya'daki böbrek nakli arasında yaygın olan Parvovirus B19'un ve Libya böbrek nakli hastalarının %35'inin B19 tarafından enfeksiyona duyarlı olduğunu göstermiştir. RT-PCR, özellikle virüs prevalansını saptadığında, gerçek viral enfeksiyonu ELISA'dan daha fazla tespit eder.

Anahtar Kelimeler: Parvovirus B19, ELISA, Böbrek Nakli, Anemi, retikülositopeni

2019, 85 sayfa
Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE USE REAL TIME-PCR TO CONFIRM ELISA RESULTS IN PARVOVIRUS B19 (PVB19) DETECTION OF PATIENTS WITH KIDNEY TRANSPLANTATION IN LIBYA

Musbah Emhamed Farag ALMBSUOT
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Bayram KIRAN

Abstract: B19 is a single strand DNA virus belongs to the Parvoviridia family and only parvovirus known to be a pathogen in human. It causing several problems in human especially in immunosuppressed patients such as organ transplant recipients. In kidney transplant patients parvovirus B19 can continue for years due to failure the immune response and it may be associated with chronic clinical manifestations such as anemia and another reticulocytopenia.

Fifty renal transplant patient (10 women and 40 men) who checked up in two main kidney transplant centers in Libya (Tripoli Central Hospital-General Hawari Hospital) during the period from first of January 2017 to end of December 2017 in different years post transplantation, the age ranged between 12-64 years old, 5ml of blood samples collected from each patient in white tube to getting serum by centrifugation them for 5 min at 3000RPM, and kept frozen at (-20) till analyses. The samples were collected support by questioner include some information about patient include age, sex, date of translation, immunosuppression drugs and medical history. All samples were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA) for detection antibody against Parvovirus B19 IgM and antibody against parvovirus B19 IgG depended on indirect ELISA principles. The positive results were confirmed by RT-PCR. The seropositive of Parvovirus B19 rate was 3/50 (6%) for IgM (acute infection) and 34/50(66%) for IgG (chronic infection). Seropositive of ParvovirusB19 in Libyan kidney transplant (Both IgM, IgG) depends on age; most age affected was between 20-39 years old. All positive results of IgM, while the (6) KT positive from 20 samples were chosen.

The conclusion demonstrated that ParvovirusB19 common among kidney transplant in Libya and 35% of Libyan kidney transplant patients were susceptible to the infection by B19, RT-PCR detect the real viral infection more than ELISA especially in case detect the prevalence of virus.

Key Words: Parvovirus b19, elisa, kidney transplant, anemia, reticulocytopenia

2019, 85 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezim boyunca rehberlik eden ve her türlü destek ve fırsatı sağlayarak değerli bilgisini benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Bayram KIRAN'a saygılarımı sunarım ve teşekkür ederim.

Son olarak, çalışma yıllarım boyunca ve bu tezin araştırılması ve yazılması süreci boyunca bana sürekli destek ve sürekli teşvik sağladığım için aileme en derin şükranlarımı sunmalıyım. Bu başarı onlarsız mümkün olmazdı. Teşekkür ederim.

Musbah Emhamed Farag ALMBSUOT
Kastamonu, Aralık, 2019



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. B19' un Tarihçesi.....	3
2.2. B19' un Virolojik Özellikleri.....	3
2.2.1. B19'un Taksonomisi.....	3
2.2.2. Viral Yapı	4
2.2.2.1. <i>Viral Kapsid Proteinleri</i>	4
2.2.2.2. <i>Yapısal Olmayan Proteinler</i>	5
2.2.2.3. <i>B19'un Genomu</i>	5
2.2.2.4. <i>B19'un Genotipleri</i>	6
2.3. B19'un Yaşam Döngüsü	7
2.3.1. Tropizm, Viral Reseptörler ve Kapsitten Ayrılma	8
2.3.2. Replikasyon	9
2.3.3. Transkripsiyon	10
2.4. B19'un Patojenitesi	10
2.4.1. B19 Aktarımı	10
2.4.1.1. <i>Kan Ürünleriyle Aktarımı</i>	11
2.4.1.2. <i>Plasenta Yoluyla Aktarım</i>	12
2.4.1.3. <i>Asemptomatik Enfeksiyon</i>	12
2.4.1.4. <i>Eritema İnfeksiyozum</i>	12
2.4.1.5. <i>Artropati</i>	15
2.4.1.6. <i>Hamilelikte B19 Enfeksiyonu</i>	15
2.4.1.7. <i>Trombositopeni</i>	18
2.4.1.8. <i>TEC ve Nötropeni</i>	18
2.4.1.9. <i>Nörolojik Hastalıklar</i>	18
2.4.1.10. <i>Miyokart İltihabı</i>	19
2.4.1.11. <i>Hepatit</i>	19
2.4.1.12. <i>Varsayımsal İlişkiler</i>	20
2.4.2. Bağışıklık Yetersizliği Bulunma Durumunda Enfeksiyon	20

2.4.2.1. <i>Kronik Saf Kırmızı Hücre Aplazisi</i>	20
2.4.2.2. <i>AIDS</i>	21
2.4.2.3. <i>Akut Lenfositik Lösemi</i>	21
2.4.2.4. <i>Virüsle Bağlantılı Hemofagositik Sendrom</i>	21
2.4.3. <i>Kırmızı Hücreli Enfeksiyonu Olan Hastalarda Enfeksiyon</i>	22
2.4.3.1. <i>Geçici Aplastik Kriz (TAC)</i>	22
2.5. <i>B19'un Epidemiyolojisi</i>	22
2.6. <i>B19 Teşhisi</i>	23
2.6.1. <i>Tanısal Sitopatoloji, Elektron Mikroskopu ve İmmünohistokimya</i>	23
2.6.2. <i>Serolojik Yöntemler</i>	24
2.6.3. <i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)</i>	25
2.7. <i>B19'a İmmün Yanıt</i>	27
2.7.1. <i>Doğal Bağışıklık</i>	27
2.7.2. <i>Kazanılmış Bağışıklık, Antikorlar</i>	27
2.7.3. <i>Kazanılmış Bağışıklık, Hücre</i>	29
2.7.4. <i>Edinilmiş Bağışıklık Hücreleri</i>	29
2.8. <i>Tedavi</i>	32
2.9. <i>Parvovirus B19 ve Böbrek Nakli</i>	33
3. <i>YÖNTEM</i>	40
3.1. <i>Çalışma tasarımı</i>	40
3.1.1. <i>Etik Onay</i>	40
3.1.2. <i>Anket Geliştirme</i>	40
3.1.3. <i>Çalışma Örnekleri</i>	40
3.1.4. <i>Çalışma Sitesi</i>	40
3.1.5. <i>Kan Örnekleri Toplama ve Analiz</i>	41
3.2. <i>B19'da ELISA testi</i>	41
3.2.1. <i>Kan Örnekleri</i>	42
3.2.2. <i>Test Üreticisi</i>	43
3.2.3. <i>IgG Kitinin İçeriği</i>	44
3.2.4. <i>IgM Kitinin İçeriği</i>	44
3.3. <i>Gerçek Zamanlı PCR- B19</i>	45
3.3.1. <i>Gerçek Zamanlı PCR Prensipleri</i>	45
3.3.2. <i>Ürün Açıklaması</i>	46
3.3.3. <i>Gerekli Malzemeler ve Cihazlar</i>	46
4. <i>SONUÇLAR</i>	47
4.1. <i>IgG Serolojik Sonuçları</i>	47
4.2. <i>IgM Serolojik Sonuçları</i>	55
4.3. <i>RT-PCR Sonuçları</i>	65
5. <i>TARTIŞMA</i>	66
6. <i>SONUÇLAR</i>	68
7. <i>ÖNERİLER</i>	69
<i>KAYNAKLAR</i>	70
<i>ÖZGEÇMİŞ</i>	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ L

Mikrolitre

Kısaltmalar

BSA	Sığır Serum Albumin
CDC	Center for Disease Control
dL	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EI	Eritema İnfeksiyozum
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	Gram
Gb4	Globotetraosylceramide
Hb	hemoglobin
HPR	Horseradish peroxides
IF	Immuno floresans
IFN	interferon
IgG	İmmünoglobülin G
IgM	İmmünoglobülin M
IUFD	İntrauterin Bebek Ölümü
KB	Kilo baz
KD	Kilo Dalton
L	Litre
mL	Mililitre
NIHF	İmmun Olmayan Hidrops Fetalis
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat Tampon
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAC	Transient Aplastic krizi
TMB	Tetra Metil Benzidin
VP	virus yapı proteini

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. B19'un Genomu.....	6
Şekil 2.2. Kırmızı kan hücrelerini enfekte eden B19'un yaşam döngüsü	8
Şekil 2.3. B19 virüs enfeksiyonunun patogenezi	13
Şekil 2.4. Eritema infeksiyozumunun tipik yüz eksantemi	14
Şekil 2.5. Dantelli, Eritema infeksiyozumlu bir çocukta ekstremitenin retiküler ekzantemisi	14
Şekil 2.6. Hidrop fetalizin belirtileri	16
Şekil 2.7. Belirgin hepatomegali ve kardiyomegali gösteren iç organlar	17
Şekil 2.8. B19'a moleküler immün yanıt.....	26
Şekil 3.1. Tanı Aracı Alegria	43
Şekil 3.2. RT-PCR ilkesi.....	46

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans.....	49
Tablo 4.2. B19 IgG testine göre yaş gruplarında prevalans.....	51
Tablo 4.3. B19 IgG testine göre plantasyondan bu yana geçen Prevalans ve zaman	53
Tablo 4.4. Prevalans ve % Hb gm(B19 IgG) testine göre.....	55
Tablo 4.5. B19 IgM testine göre yaş gruplarında prevalans	57
Tablo 4.6. B19 IgM testine göre cinsiyet gruplarında prevalans	59
Tablo 4.7. B19 IgM testine göre plantasyondan bu yana geçen Prevalans ve zaman	61
Tablo 4.8. Prevalans ve %Hb gm (B19 IgM) testine göre	63
Tablo 4.9. B19 IgM ve B19 IgG'ye göre virüs ile pozitif teşhis edilen örnek oranında bir değişiklik var mı?.....	64
Tablo 4.10. RT-PCR sonuçları.....	66

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 4.1. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans.....	50
Grafik 4.2. B19 IgG testine göre yaş gruplarında prevalans.....	52
Grafik 4.3. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans.....	54
Grafik 4.4. Prevalans ve %Hb gm(B19 IgG) testine göre.....	56
Grafik 4.5. B19 IgM testine göre cinsiyet gruplarında prevalans	58
Grafik 4.6. B19 IgM testine göre cinsiyet gruplarında prevalans	60
Grafik 4.7. B19 IgM testine göre plantasyondan bu yana geçen prevalans ve zaman	62
Grafik 4.8. Prevalans ve %Hb gm(B19 IgM) testine göre.....	64
Grafik 4.9. B19 IgM ve B19 IgG'ye göre virüs ile pozitif teşhis edilen örnek oranında bir değişiklik var mı?.....	65

1. GİRİŞ

Tek zincirli DNA virüsü olan Parvovirüs B19 (B19), 1970'li yıllarda kan donörlerinden alınan serumların hepatit B taraması yapılırken Yvonne Crossart tarafından 19 numaralı örnekte anormal bant görüldüğünde keşfedilmiştir. IgM ve IgG antikorlarının aynı anda ortaya çıkmasıyla immün aracılı tipik döküntü (tokatlanan yanak görünümü) oluşmaktadır [1, 2].

B19, köpek parvovirus ve kedi panleukopenia virüsü gibi birçok hayvan parvovirüs tipinden oluşan Parvoviridae ailesine mensup tek zincirli bir DNA virüsüdür. Virüs, hızla bölünen eritroid progenitör hücrelerinde çoğalmaktadır. Diğer hedef hücreler daha az açıklanmıştır ve miyokard dokusunu içerdiği görülmüştür. Parvovirüs ile enfeksiyon dünya çapında çok yaygın olduğu tespit edilmiştir. Konjesyon çocukluk döneminde sıklıkla görülmektedir. Konjesyon erişkinlikte düşük oranlarda devam etmekte olup yetişkinlerin %70-85'i geçmiş enfeksiyonun serolojik bulgularını göstermektedir. Bulaşıcılık, ılıman iklimlerde mevsimsel değişiklik göstermektedir. Enfeksiyonun kış ve ilkbaharda daha fazla yaygın olduğu tespit edilmiştir. Enfeksiyon bulaşması genellikle virüslü aerosol damlacıklarının solunmasıyla gerçekleşmektedir. Enfeksiyon ayrıca anneden fetüse dikey olarak bulaşabilmekte ve daha nadir olarak kan ürünleri transfüzyonu, kemik iliği nakli ve organ nakli yoluyla da bulaşabilmektedir [3].

İmmünkomponent B19, hamile kadınlarda eritem infektiosumuna (beşinci hastalık) neden olmakta ve fetalis hidropsine yol açmaktadır. Organ nakli alıcıları gibi immün sistemleri baskılanmış hastalarda B19 virüsü, immün tepkinin başarısızlığından dolayı yıllarca varlığını sürdürebilir ve anemi gibi kronik klinik belirtilerle ilişkilendirilebilmektedir. Nakil yapılan hastalarda B19 enfeksiyonu transfüzyon sırasında donör organı veya kan ürünleri yoluyla bulaşmaktadır. İmmünsüpresif tedaviye bağlı olarak artan duyarlılık olası B19 enfeksiyonunun immün sistemi baskılanmış hastalarda anemi nedeni olarak görülmemektedir. Buna karşın kan kaybı veya retikülositopeni olmadan anemi, potansiyel B19 enfeksiyonu için önceden uyarı olduğu varsayılmaktaydı. Kırmızı hücre aplazisi ve şiddetli anemi ayrıca organ nakli alıcılarında B19 enfeksiyonunun tezahürleridir ve insan eritroid prekürsör hücreleri

için virüs tropizmiyle doğrudan ilgili olduğu belirtilmiştir. Kemik iliğinde virüs varlığı, böbrek nakli yapılan hastalarda birçok B19 enfeksiyonu vakasına rağmen eritropoezisin uzun süreli baskılanmasına neden olmaktadır. Enfeksiyonla ilgili çeşitli komplikasyonlar bildirilmiştir. Anemik transplante hastalarda aktif B19 enfeksiyonu insidansını değerlendirmek için sadece birkaç çalışma yapılmıştır, bu çalışmalarda enfeksiyon insidansının %23-31,1 arasında değiştiği bildirilmiştir [4, 5].

Özellikle böbrek nakli alıcıları donörden, topluluktan veya latent-persistan endojen virüsün reaktivasyonundan semptomatik PV B19 enfeksiyonu alabilmektedirler. Böbrek nakli hastalarında çok sayıda B19 enfeksiyonu vakası bildirilmiş olmasına rağmen B19 enfeksiyonunun klinik mesuliyeti tam olarak açıklanmamıştır. Üstelik böbrek nakli alıcılarında B19 enfeksiyonu ile anemi arasındaki ilişki net olarak tanımlanmamıştır [6].

Libya'da böbrek nakli sırasında ciddi pozitif B19 için daha önceden prevalans tanımlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı ELISA ile virüse karşı antikorları saptamak suretiyle Libya'daki böbrek naklinde (vaka serisi) Parvovirus B19'un serolojik yüzdesini belirlemektir. Bu çalışmanın sonuçları RT-PCR ile doğrulanmıştır ve sonuçları diğer ülkelerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

Parvovirus B19, 1974'te Yvonne Cossart (Avustralyalı virolog) tarafından keşfedilen ilk insan parvovirus B19'udur (yalnızca 2017 yılına kadar) [1]. B19'a özgü serolojik testin gelişimi, insanlarda ilk semptomatik enfeksiyon raporunun yayınlanmasına öncülük etmiştir. 1980'de yayınlanan bu raporda kısa ateşli bir hastalık geçirmiş iki asker tanımlanmıştır. Daha sonra orak hücre anemili hastalarda geçici aplastik krizin etiyolojik ajanı olarak tanımlanmıştır. Okul çağındaki çocuklar arasında eritem infeksiyozumu için parvovirüs enfeksiyonu ile bu iki hastalık arasında B19'un eş zamanlı raporlarıyla bir ilişki kurmuştur [2].

2.1. B19'un Tarihçesi

B19, 1974 yılında Yvonne Cossart'ın Londra'daki ekibi tarafından asemptomatik kan donörünün serumunda tesadüfen keşfedilmiştir [1]. Virüsün adı, B listesinin 19 numaralı numunesinin liste konumundan gelmektedir. Elektron mikroskobu (EM) ile hayvan parvovirüslerine benzer 23 nm çapında parçacıkların varlığı ortaya koyulmuştur. 1983-1984 yıllarında B19'un viral genomunun yüzeysel proteinlerle çevrili 5,5 kb uzunluğunda tek zincir DNA molekülüne sahip olması ile karakterize edilmektedir [7, 8]. B19 klinik varlığının tanımı virolojik karakterizasyonu ile uyumludur. B19 ve semptomatik hastalık arasındaki ilk bağlantı 1981'de SCD'li hastalarda geçici aplastik krize (TAC) neden olduğu varsayımıyla gösterilmiştir. Çocuklarda eritema infeksiyozumu (beşinci hastalık) akut B19 enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır [9, 10]. Yapılan çalışmalar gebelikte B19'un neden olduğu hidrops fetalisi ve yetişkinlerde simetrik artroplastiyi göstermiştir [11, 12].

2.2. B19'un Virolojik Özellikleri

2.2.1. B19'un Taksonomisi

Grup: Grup II ssDNA

Familiya: *parvoviridia*

Tür: B19 virus

B19 virüsü küçük DNA virüslerinin Parvoviridia ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Pozitif tek sarmallı lineer DNA genom içeren, zarflanmamış bir ikosahedral nükleokapsite sahip olduğu gösterilmiştir. Kapsid proteinleri ikosahedral simetride düzenlenmektedir. B19, 20-25 nm çapındadır ve 5,6 kb uzunluğunda genoma sahip olduğu saptanmıştır. B19 kapsidi 83 kDa'lık küçük yapısal bir protein olan VP1 ve 5 kDa'lık ana yapısal bir protein olan VP2'den oluşmaktadır. VP2 toplam kapsidin yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır ve VP1 geri kalan %5'i oluşturmaktadır (Finkel vd., 1994). Kemik iliğinde kırmızı kan hücresi öncüllerini istila etme kabiliyeti nedeniyle Eritrovirüs olarak sınıflandırılmıştır. B19 60 C°'de hayatta kalma yeteneğine sahiptir [14].

2.2.2. Viral Yapı

B19, ikosahedral virionu olan zarflanmamış bir virüstür. B19, pozitif veya negatif polariteye sahip iki yapısal protein (VP1 ve VP2) ile çevrili lineer tek iplikçikten (ssDNA molekülü) oluşmaktadır.

2.2.2.1. Viral kapsid proteinleri

Virion, %95'i VP2'ye (58 kDa) ve %5'i VP1'e (83 kDa) ait olan 60 yapısal alt birimden oluşmaktadır. VP1 ve VP2 örtüşen okuma bölgelerinden köken almaktadır ve VP1'in eşsiz bölgesi VP1u olarak adlandırılmaktadır. VP1'in N-terminalindeki 227 ilave amino asit hariç, aynı şekilde kalıcı olarak enfekte olmuş bireylerde %3,5-%6,8/8,2 arasında değişen yüksek sekans değişkenliği sergilemektedir. Bu tür bir değişiklik konservatif olmayan amino asit değişikliklerine neden olabilmektedir (yüklenmemiş amino asit kalıntıları polar amino asitlerle değiştirilir) [7, 15, 16]. Bu bölge immün yanıtın formüle edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu tür mutasyonlar muhtemelen değiştirilmiş bir viral yüzeye ve enfekte olmuş organizmanın B19V'yi temizleyememesine ve kalıcı enfeksiyon gelişmesine yol açabilmektedir [17]. Memeli parvovirüslerinin aksine ve viriondaki düşük konsantrasyonuna rağmen VP1u, antikorları nötralize etmek için majör antijenik etki göstermektedir. Ayrıca enfeksiyonun başlamasında rol alan fosfolipaz A2 (PLA2)

motifine sahiptir. VP1u'nun, otoimmün tepkilerin indüklenmesinde ve tam olarak anlaşılmayan mekanizmalarla kronik inflamasyonda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [16].

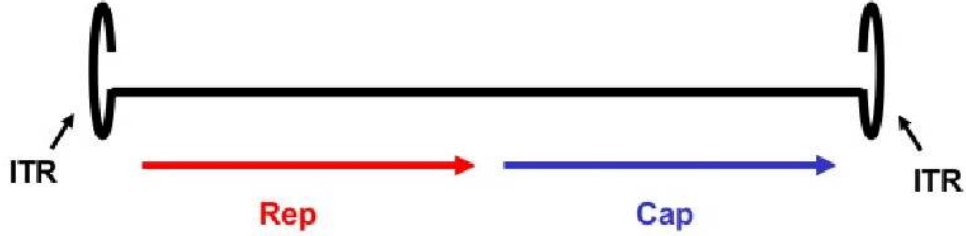
2.2.2.2. Yapısal olmayan proteinler

B19, en fazla olanı NS1 olan birçok yapısal olmayan (NS) proteine sahiptir. 77 kDa'luk bir moleküler kütle ve bölgeye özgü DNA bağlama, DNA-kırpma, helikaz fonksiyonu ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesi dahil çoklu fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. NS1, bazı hücresel promotorlerin yanı sıra viral P6 promotorini transregüle etmektedir. Böylece B19V replikasyonunu kontrol etmektedir [18,19]. Eritroid prekürsörleri için yüksek sitotoksik olan protein kaspaz 3 ile etkileşimi yoluyla apoptozu indükleyebilmektedir. B19V ile ilişkili klinik bulguların çoğunun NS1 sitolitik veya apoptotik aktivitesiyle enfekte eritroid prekürsörlerin hasarının ilişkili olduğu düşünülmektedir [20].

2.2.2.3. B19'un genomu

B19 genomu, 383 nt terminal tekrarları ile çevrili 4830 nt dahili kodlama sekanslarından oluşmaktadır [7]. Her tekrarın 361 uzak uç nükleotitleri genellikle çatal olarak gösterilen saç tokalarını birleştirebilen bir palindrom oluşturmaktadır [21]. Saç tokası yapıları tüm parvovirüslerde bulunan ve 'flip-flop (Şekil 2.1) olarak adlandırılan iki farklı konfigürasyonda bulunmaktadır [22]. Bunula beraber çoğaltma için başlangıç alanları olarak görev yapmaktadırlar [23].

Pavrovirüs Genomu



5 kb ssDNA, ters terminal tekrarları (ITR)

Çoğaltma için gerekli rep gen

Cap geni kapsid proteinlerini kodlar

Şekil 2.1. B19'un Genomu

B19 genomu, 'sol' genom kısmı tarafından kodlanan NS1 proteini ve sağ protein tarafından kapsid proteinleri ile kodlanan iki ana ORF'ye bölünmüştür [7]. Böyle küçük bir genomun kodlama potansiyeli üst üste binen büyük transkriptler üreten çoklu okuma çerçevelerinin kullanılmasıyla arttırılmaktadır. B19, diğer parvovirüslerden farklı olarak yaklaşık dokuz çakışan poli- (A) transkriptine sahiptir [23]. Protein X'i kodlayan ve VP1 geni içinde bulunan kısa bir ORF yakın zamanda tanımlanmıştır. Bu hipotetik proteinin B19V enfeksiyöz süreci için işlevleri, viral kültürün kısıtlı olması ve enfeksiyöz klonların bulunmaması nedeniyle tam olarak tanımlanmamıştır [19]. Enfeksiyon sırasında tek iplikli B19 genomunun istilasının DNA hasarına ve hücre döngüsünün durmasına neden olabileceği de öne sürülmektedir [24].

2.2.2.4. B19'un genotipleri

Günümüzde aralarında tahminen %10'dan fazla bir sapma ile üç B19 genotipi (1, 2 ve 3) tanımlanmaktadır [25]. Genotip 1, B19 prototipiyle dünya çapında en yaygın genotip olarak tanımlanmaktadır.

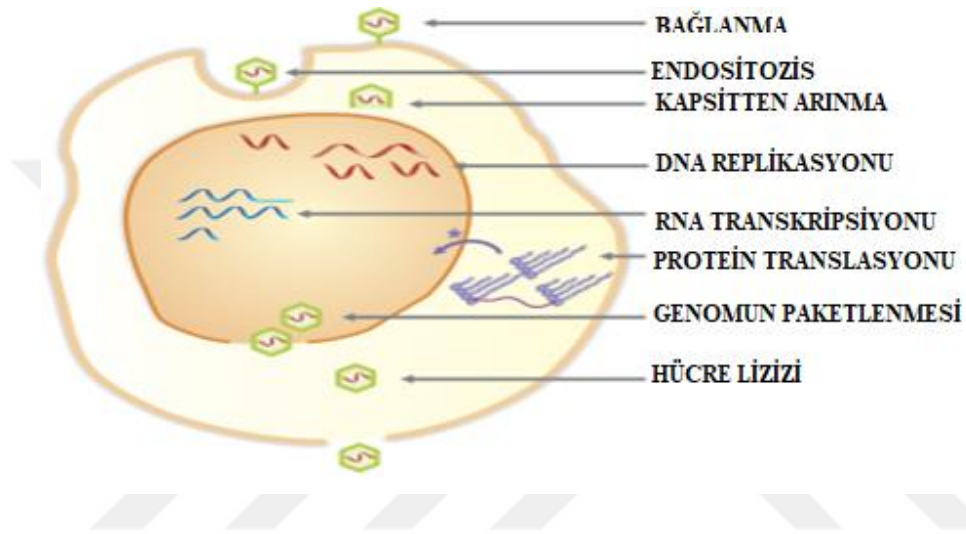
Genotip 1'de kümeler arası değişkenlik yaklaşık %2 olduğu için ek olarak iki alt gruba (1A ve 1B) bölünmektedir [26]. Genotip 2 (prototip A6 ve LaLi) birçok Avrupa ülkesinden, ABD'den ve Brezilya'dan gelen hastalarda tespit edilmiştir. Genotip 3 (prototip V9 ve D91.1), 3A ve 3B olarak iki alt genotipe ayrılmaktadır. Genotip 3'ün sirkülasyonu esas olarak Brezilya ve Gana gibi tropikal ülkelerde tanımlanmıştır [27, 28]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile yeni bir parvovirüs dizisi olan PARV4'ün pıhtılaşma faktörü konsantrasyonlarında tanımlanması sağlanmıştır. PARV4, bugüne kadar tarif edilen B19V genotiplerinden genetik olarak farklı olduğu düşünülmektedir ve muhtemelen Parvoviridae ailesinin yeni bir genetik türü olarak tanımlanmaktadır [29,30,31]. Viral genotiplerin sekansları arasında önemli bir farklılık olmasına rağmen, nükleotit değişikliklerinin çoğu üçüncü bir pozisyondadır ve amino asit varyasyonu azalmaktadır. Sonuç olarak yapısal proteinler klinik örneklerde farklı B19V genotipleri arasındaki yüksek serolojik çapraz reaktivite derecesinden sorumlu olan yaklaşık %96 benzerlik ve düşük antijenisiteye sahip olduğu gösterilmektedir [7].

2.3. B19'un Yaşam Döngüsü

Tropizm ve B19 transkripsiyon haritası, Parvoviridae'nin diğer tüm üyelerinden ayrı bir cins (Erythrovirus) olarak ayırt edilerek bu patojene oldukça spesifiktir. B19, otonom olarak kopyalanan bir parvovirüstür. Tek bir poliadenilasyon sahasında B19'un sonlandırıcı üç transkriptini (R1, R2 ve R3) üreten MMV ile karşılaştırıldığında diğerleri alternatif ekleme ile işlenen en az 12 RNA transkriptini kullanır [23, 32]. B19 genomunun ortasında ve sağ kısmında çoklu poliadenilasyon bölgeleri bulunmaktadır. B19 replikasyonu, enfekte olmuş hücrenin çekirdeğinde gerçekleşmektedir ve çoğu DNA virüsü için ortak aşamaları içermektedir (Şekil 2.2):

- Virüsün konak hücre reseptörlerine bağlanması;
- İçselleştirme;
- Genomun çekirdeğe translokasyonu;
- DNA kopyalama;

- RNA transkripsiyonu;
- Kapsidlerin montajı;
- Genomun paketlenmesi; ve
- Bulaşıcı virionların salınmasıyla hücre erimesi [7, 33].



Şekil 2.2. Kırmızı kan hücrelerini enfekte eden B19'un yaşam döngüsü [7].

2.3.1. Tropizm, Viral Reseptörler ve Kapsitten Ayrılma

B19 insan eritroid progenitörleri, fetal karaciğer ve göbek kanı eritroblastlarında olağanüstü bir tropiziteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu özellikten sorumlu olan faktörler arasında, B19 ana reseptörü olan kan grubu Antijeni (globoside, Gb4) ve eritroid hücrelerinin bulundurması ve optimum B19V replikasyonu ve transkripsiyonu için vazgeçilmez hücre içi faktörler sağlayan hızlı eritroid hücrelerinin bölünmesi bulunmaktadır. Genetik olarak P antijeni olmayan bazı kişiler doğal olarak B19V enfeksiyonuna dirençli olduğu bilinmektedir [7, 34].

Bununla birlikte P antijenini ifade eden diğer hücre tipleri (özellikle böbrek, karaciğer dokularında, sinoviyositlerde, trombositlerde, endotel ve vasküler düz kaslarda olanlar) B19V girişine izin vermemektedir [35]. Böylece P antijeni enfeksiyon için gerekli ancak yeterli enfeksiyonun gerçekleşmesi için bir faktör olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle virüsün hücreye girmesine yüksek afinitede (a) -

5 (b) -1 integrinler aracılık etmektedir. Yüksek P antijeni ifade eden ancak (a) -5 (b) -1 integrinleri ifade etmeyen olgun kırmızı kan hücreleri, B19V'yi bağlamaktadır ancak bu viral girişe izin vermemektedir. Buna karşılık yüksek P antijeni ve (a) -5 (b) -1 integrinleri içeren eritroid progenitörleri, P antijeni-integrin aracılı girişe izin vermektedir. Viral patogenezin doğal seyrinde, kırmızı kan hücrelerinin vücutta B19V'nin etkin bir şekilde dağıtıcıları olarak hizmet ettiğine inanılmaktadır. Globosidin ayrıca virüsün içselleşmesine yol açan müteakip etkileşimler için gerekli olan kapsidin yeniden düzenlemesine aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu bulgular virüs tropizminin neden yüksek seviyelerde P antijen ve ko-reseptörleri içeren eritroid progenitör hücreleri ile sınırlandırıldığını ve reseptörlerin yetersizliği nedeniyle etkili replikasyona izin vermeyen çok sayıda P antijen pozitif eritroid olmayan hücresiyle sınırlı olduğunu açıklayabilmektedir [34, 35, 36].

B19 virüsü reseptörlere bağlandıktan sonra klatrin aracılı endositoz yoluyla hedef hücreye girmektedir. B19'un kaplanma mekanizması netleştirilmemiştir ancak kapsidin değişmeyen organizasyonu, genomun virion sökme işlemi olmadan serbest bırakıldığını göstermektedir [37].

2.3.2. Replikasyon

Küçük genomuna rağmen B19V DNA'sının hem tek iplikli hem de lineer olmasından dolayı replikasyonu karmaşık bir süreçte seyretnmektedir. B19V konukçu hücrenin sentetik mekanizmalarının işlevlerini, yuvarlanma çemberi çoğaltması adı verilen eski bir sarmal yer değiştirme mekanizması kullanarak kendi çoğaltmak için bozmaktadır. Sonuç olarak B19V terminal saç tokası modeliyle birbirine bağlanan DNA ara ürünleriyle çoğalmaktadır [23].

Her palindromun 30 ucu, bir pozitif DNA sentezinin başlatılması için kendi kendine bir primer görevi görmektedir. B19V replikasyonu sırasında, kusursuz şekilde eşleştirilmiş termini, saç tokasının açılması ve yeniden katlanması için enerji açısından elverişli bir ortam sağlamaktadır. B19 dimerik replikatif formları genellikle enfekte olmuş kemik iliğinde saptanır ve bu nedenle büyüyen iplikçik, iki artı ve iki eksi iplikten üretilen bir tetramerik form üretmek için kendi üzerine çoğaldığına inanılmaktadır [38].

2.3.3. Transkripsiyon

B19V transkripsiyonu sırasında en az 12 transkript, tek bir pre-mRNA'dan alternatif ekleme ve poliadenilasyon yoluyla üretilmektedir. Poliadenilatlanmış transkriptler, eklenmiş veya eklenmemiş mRNA'lar halinde sentezlenmektedir. Eklenmemiş mRNA'lar NS1 proteinini kodlamaktadır. Dahili olarak pA-p (proksimal) pozisyonda poliadenile edilmiş transkriptler işlevi bilinmeyen 7,5 kDa'luk protein kodlamaktadır. Distal poliadenilasyon sahasında poliadenilatlanmış tüm B19 transkriptleri (pA-d) ilk intronlarını (D1 ila A1-1 veya D1 ila A1-2) çıkarmaktadırlar. Ek olarak eklenmemiş olanlar kapsid proteinleri VP1 ve VP2'yi kodlamaktadırlar. Ayrıca mRNA'lar ikinci intronun (D2 ila A2-1) eksizyonu ile eklemeye tabi tutulduktan sonra, B19V taşınmasında rol oynadığı düşünülen yapısal olmayan 11 kDa'luk proteini çekirdekte kodlamaktadır [39].

2.4. B19'un Patojenitesi

2.4.1. B19 Aktarımı

B19 enfeksiyonu başlıca solunum damlacıkları ile gerçekleşmektedir ancak aynı zamanda kontamine kan, organ nakli ve anneden fetüse dikey geçiş yoluyla da gerçekleşmektedir [7]. B19'un solunum yoluyla enfeksiyonundan sonra, nazofarengeal lenfoid dokuda kısa bir replikasyon meydana gelmektedir. Daha sonraki aşamada 1 mL'de 10¹³ kopyayı aşabilen viral yüke sahip büyük bir viremi izlemektedir. Bu yüzden B19 vücutta hızla yayılabilmektedir ve genel eritroblast enfeksiyonu üreten kemik iliği mikro çevresine girmektedir [7, 10]. Akut viremik fazda ortaya çıkan lenfopeni, nötropeni ve trombositopeni önemli olmadığı varsayılmaktadır. B19 enfeksiyonunda bulunan trombositopeninin nedenleri, yapısal proteinlerin sentezi olmadan trombositlerde viral replikasyonun varlığı ile kısmen açıklanabilir [40].

2.4.1.1. Kan ürünleriyle aktarımı

B19V'nin kan ürünleriyle aktarımı iki önemli viral özelliğinden dolayı yaygın olduğu varsayılmaktadır. Birincisi, asemptomatik bireylerin kemik iliğinde kalıcı enfeksiyon [41] ve ikincisi, ilk enfeksiyon/yeniden enfeksiyondan sonra uzun süreli replikasyondur (birkaç yıla kadar) [42]. Asemptomatik kan donörlerinde B19 DNA prevalansı (%1) ayırma için kullanılan plazma havuzlarını kontamine etmek için yeterli olduğu gösterilmiştir [43]. Salgın hastalıklar sırasında asemptomatik donörler sıklıkla kan toplamalarının sınırsız bir şekilde kirlenmesini sağlayan eş zamanlı antikorlar olmadan 4106 IU 1 mL yüksek viral titreler göstermektedirler [44]. Sonuç olarak B19V kan transfüzyonu veya kemoterapötik prosedürlerle kolayca iletilmektedir. Akut B19V enfeksiyonu, faktör IX konsantrelerinin veya faktör VIII konsantrelerinin ısıtılma işlemi görmüş yüksek saflıkta ısıtılması ve faktör VIII veya protrombin kompleksi konsantrasyonlarının transfüzyonundan sonra rapor edilmiştir. Bu tür bulaşma türlerinin kısaltılmış kırmızı hücre sağkalımı olan bireyler (kronik hemolitik koşullar), hamile kadınlar ve immün sistemi baskılanmış hastalar gibi birçok yüksek riskli hasta kategorisinde ciddi sonuçları olabilmektedir [42,45]. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda B19V enfeksiyonu sadece kan transfüzyonu veya havayolu geçişinden değil aynı zamanda yeniden enfeksiyon ve yeniden aktivasyondan da kaynaklanabilmektedir. Bu hastalarda yeniden enfeksiyonu ve reaktivasyonu ayırt etmek zordur ancak her iki mekanizmada kalıcı retikülositopeni ve kronik anemiye yol açtığı gözlemlenmiştir [46]. Kan bağışlarında viral DNA'nın varlığı, genellikle anti-B19V immünoglobülin G'nin (IgG) varlığı ile ilişkilidir, ancak bu antikorların transfekte edilmiş fraksiyondaki enfektiviteyi ortadan kaldırması veya azaltması tartışmaya açık bir konudur. Yine de nötrleştirici anti-B19V IgG antikorlarının mevcudiyetinde B19V'nin transfüzyon transmisyonu mümkündür ve virüs enfektivitesini inhibe etme nitel yetersizlikleri (nitel kusurlar) ile açıklanmaktadır [47,48].

2.4.1.2. Plasenta yoluyla aktarım

B19'un dikey geçişi, maternal enfeksiyon vakalarının yaklaşık %30'unda meydana gelmektedir ve bu vakaların %2-5'inde fetal hidrops veya fetal ölümle sonuçlanmaktadır. B19'un fetal aktarım mekanizması ve buna bağlı fetal enfeksiyon

gelişimi tam olarak açıklanamamıştır. Son çalışmalarla plasenta villusundaki fetal kapiller endotelinin B19 replikasyonunu destekleme ihtimalini göstermektedir. Plasental endotelin enfeksiyonu, anne ve fetus arasındaki kan değişiminin yapısal ve fonksiyonel olarak tahrip olmasına neden olabilir ve B19'un fetal tutulumunu kolaylaştırabilir. Transplasental iletim riskinin en yüksek olduğu birinci ve ikinci trimesterler arasında bulunmaktadır. B19 onkojenik özellik göstermediğinden gebeliğin bitişini göstermemektedir [49, 50].

2.4.1.3. Aseptomatik enfeksiyon

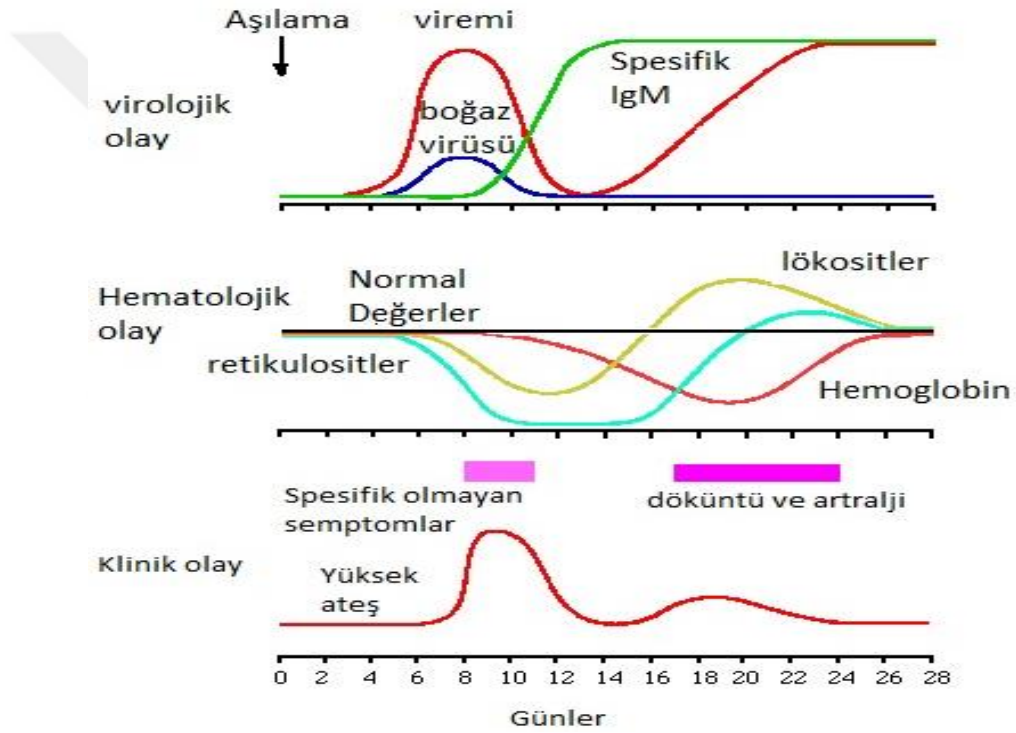
Subklinik B19 enfeksiyonu hem çocuklarda hem de erişkinlerde yaygın bir bulgu olarak görülmektedir. Enfekte olan kişilerin yüzde yirmi beşinde spesifik semptomların gözlenmediği belirlenmiştir. IgM pozitif kadınların yarısından azında döküntü veya artralji belirtileri gözlenmiştir [51]. Hemolitik anemili hastalarda son transfüzyonun ardından görülen aseptomatik serokonversiyon, semptomların konağın kusurlu eritrositlerinden daha uzun ömürlü eritrosit transfüzyonu ile maskelenebileceğini göstermektedir [52]. Bazı durumlarda genel gripten ayırt edilemeyen spesifik olmayan semptomlar tespit edilmiştir [51].

2.4.1.4. Eritema infektiozum

Beşinci hastalık (Eritema infektiozum-EI) olarak adlandırılan enfeksiyon çocuklarda en sık görülen enfeksiyondur [53]. Prodromal semptomlar genellikle fark edilmemektedir ancak ateş, burun akıntısı, baş ağrısı ve bulantı gibi belirtiler olabilmektedir. Beşinci hastalık, enfeksiyondan 18 gün sonra başlayan yanakları içeren nispi çevresel soluk, tokatlanmış yanak görünümüne sahip yüz eritemiyle karakterize edilmektedir. 1-4 gün sonra gövde ve uzuvları içeren döküntülerden oluşan ikinci bir aşama ortaya çıkmaktadır. Döküntü, özellikle aplastik krizi olan çocuklarda nadir gözlenmektedir bunun nedeni uzun süreli viremi ve IgM eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Ek olarak aplastik krizi olan hastalar sıklıkla kan transfüzyonu almaktadırlar. Bu nedenle herhangi bir döküntü transfüzyon döküntüsüne atfedilebilmektedir. Döküntü sıklıkla dantelli veya retikülerdir ve döküntülerin fistopedik bir görünüm almasına neden olan genellikle merkezi bir solmaya maruz kalan pembe makulalardan oluşmaktadır. Döküntüler geçici veya

tekrarlayabilmektedir. Yoğunluktaki dalgalanmalar güneş ışığına ve ısıya maruz kalma gibi çevresel faktörlerle değişebilmektedir. Kaşıntının veziküller ve pullu dermatit ile ilişkisinin olduğu düşünülmektedir [53].

ET'nin klasik rotası üç ayrı aşamaya ayrılabilir. 4-14 günlük bir inkübasyon süresinden sonra ortaya çıkan ilk aşama, düşük dereceli ateş, baş ağrısı ve gastrointestinal semptomlarla karakterize hafif prodromal bir hastalıktır. Sıklıkla tanınamayan bu aşama, viremi dönemine ve bulaşıcılık dönemine karşılık gelir (Şekil 2.3.) [54].



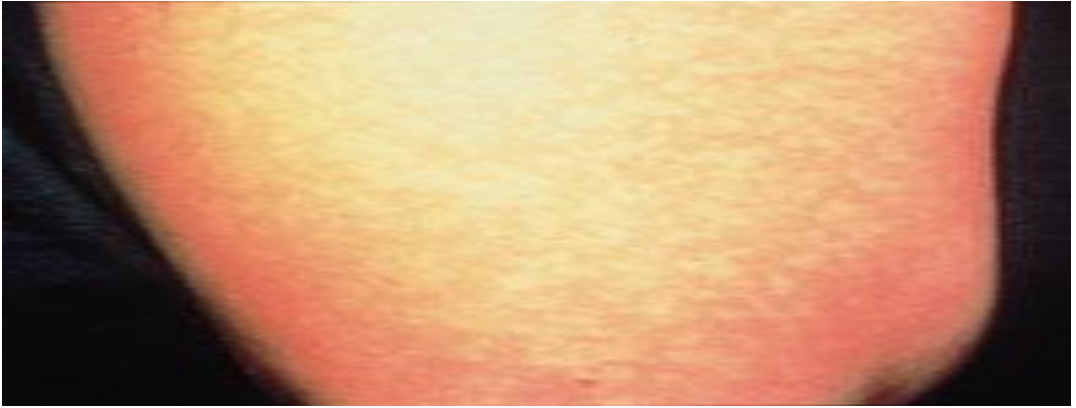
Şekil 2.3. B19 virüs enfeksiyonunun patogenezi [54].

Hastalığın ikinci evresi, prodromdan 3-7 gün sonra meydana gelmektedir ve parlak bir eritematöz fasiyal eksanteminin ortaya çıkması ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.1). Bu ekzantem en sık malar primerleri içerdiğinden, burun köprüsünü ve periferik alanları ayırdığından, karakteristik "tokatlanmış-yanak" görünümü belirginleşmektedir. Bu aşama çocuklarda erişkinlere göre daha sık görülmektedir ve ekzantem güneş ışığına maruz kaldıkça daha belirgin hale gelebilmektedir [54].



Şekil 2.4. Eritema infeksiyozumunun tipik yüz eksantemi [163].

Hastalığın üçüncü aşaması, yüz ekzanteminin belirmesinden 1-4 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Gövdede ve ekstremitelerde dantelli, eritematöz, makülopapüler ekzantın ortaya çıkmasıyla karakterize edilmektedir (Şekil 2.2). Bu patlama kaşıntılı olabilir ve genellikle 1-3 hafta boyunca tekrarlamasıyla belirgindir.



Şekil 2.5. Dantelli, Eritema infeksiyozumlu bir çocukta ekstremitenin retiküler ekzantemisi [163].

Eritema infeksiyozum evrelerinin sınıflandırılması yararlı olsa da belirgin özellikleri değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin yüz ekzantemi bazı hastalarda olabilmekte ancak diğerlerinde olmayabilir [56].

2.4.1.5. Artropati

Eritema İnfeksiyozumlu çocuklarda artralji insidansı yaklaşık %10 ya da daha az olduğu, yeni başlayan artriti olan çocukların %19'unda B19 enfeksiyonu gözlenmiştir.

Artralji ve artrit erişkinlerde primer B19 enfeksiyonunun en sık görülen belirtileridir. Kadınların %60'ını ve erkeklerin %30'unu etkilemektedir. Dermal affeksiyon ise yetişkin popülasyonunda görülme sıklığı az ve karakteristiktir [57]. Artropati başlangıcında dolaşımdaki antikorlarla çakıştığından immünolojik bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Eklem semptomları, belirli bir erozyon göstermeyen metakarpofalangeal eklem (%75), dizler (%65), el bileği (%55) ve ayak bileklerini (%40) içeren akut, orta derecede şiddetli bir periferik poliartrit olarak görünmektedir [59]. Kronik B19 artropatili hastaların yaklaşık %50'si romatoid artrit tanısındaki belirtileri göstermektedir [58].

2.4.1.6. Hamilelikte B19 enfeksiyonu

Hidrop fetaliz

Parvovirus B19 enfeksiyonu non-hidrop fetalize neden olur. Ayrıca, fetal B19 enfeksiyonunun fetal veya konjenital anemiye, düşük veya ölü doğuma neden olabileceği yada bir asemptomatik kendini sınırlayan olayla sonuçlanabileceği bulunmuştur [60]. Fetal hasarın patogenezi, eritrositlerin yaşam süresini azaltan aplastik kriz hastalarınıninkine benzerlikler sergilemektedir. Fetal karaciğerdeki eritroblastlar, B19 enfeksiyonunun belirtilerini gösterir. Bu durum, patognomonik sitopatolojiyi (Şekil 2.6), viral DNA ve antijeni kapsar [61]. Uteroda enfeksiyon kalıcıdır ve ciddi anemi, yüksek etkili kalp yetmezliği ve ölüm ile nitelendirilir. Fetal miyokardit nedeniyle bozulan kan dolaşımı sıvı birikimine neden olabilir. Ayrıca, B19 enfeksiyonu non-Hidrop uterus içi fetal ölüm vakalarıyla da ilişkilendirilebilir.



Şekil 2.6. Hidrop fetalizin belirtileri [163].

Gebelikte primer B19 enfeksiyonunun görülme sıklığı %1-5 olarak ve sonraki transplasental geçiş ise %24-33 olarak öngörülmüştür [63]. Enfeksiyondan takip eden Hidrop gelişme riski, daha eski çalışmalarda (%0-24) değiştiği belirtilirken son çalışmalarda ise, bu oran büyük olasılıkla %1-6'ya düştüğü ifade edilmiştir [64].

Bununla birlikte, primer enfeksiyon teşhisi konmuş gebe kadınlarda, genel anormal sonuç riski yaklaşık %5-10 arasındadır [63]. Enfeksiyonu takip eden olumsuz bir fetal sonuç ihtimali, karaciğerdeki hemopoietik aktivite periyodu ile korelasyon göstermekle birlikte, gebeliğin en fazla 11-23 haftaları gibi görünmektedir [65]. Fetal anemi, eritrositlerin intravenöz transfüzyonu ile düzeltilebilir [66]. Hidrop fetalisin vaka ölüm oranı %50'lere kadar ulaşabilir, ancak transfüzyonun faydalı olduğu kanıtlanmış ve ölüm oranı %18'e düştüğü gözlenmiştir [67]. Ayrıca, ekstrapmedüler hematopoez, konjenital enfeksiyonun olası bir sonucudur. *Parvovirus B19*'un döküntü, anemi, hepatomegali (Şekil 2.7) ve kardiyomegali ile kendini gösteren ırsi bir enfeksiyon sendromuna neden olduğunu gözlenmiştir [68, 69].



Şekil 2.7. Belirgin hepatomegali ve kardiyomegali gösteren iç organlar [64].

Konjenital anemi

Hematolojik değerlendirme, incelenen B19 ile ilişkili hidropik fetüslerin her birinde anemi olduğunu göstermiştir [70]. Rahim içi B19 enfeksiyonu ve hidroplarının sıkça rapor edilmesine rağmen, konjenital anemi ile ilişkilendirilen risk düşüktür [71]. Genellikle, enfeksiyon, öldürücü hidropların veya virüsün yok olarak hastalığın daha hafif seyretme durumu ayda virüs etkisinin dönem öncesi iyileşmesi gibi iki sonuçtan birine yol açar. Bununla birlikte, konjenital anemi vakalarının az rastlanırlılığı teşhis anında da belirtilebilir [72].

2.4.1.7. Trombositopeni

Çocuklarda, idiyopatik trombositopenik purpura vakalarının çoğu akut başlangıçlıdır ve çoğunlukla, ardısıra spesifik bir viral enfeksiyon gözlenir [73]. Buna göre, B19 enfeksiyonu belirtisiz orovort trombositopeni ile sonuçlanabilir. Ağırlıklı olarak merkezi ve çevresel bir tipten oluşur [74]. Merkezi kökenli trombositopeni kemik iliği baskılanmasından kaynaklanmaktadır. Muhtemel sitopatoloji etkisi, NSI proteininin megakaryositik koloni oluşumunu inhibe ettiğini belirlemesine ait bulgulara dayanmaktadır. Bu durum, B19'un eritroid progenitör hücresinin ötesindeki doku tropizmini ve viral proteinlerin, viral DNA için yasaklı hücre popülasyonlarının toksik olabileceğini gösterir [75]. Periferik kaynaklı yıkıcı trombositopeni, retikülo

endotel sisteminde ardışık aşırı trombosit atılımına immünolojik olarak aracılık edilen tromboantikor üretiminden kaynaklanabilir [75].

2.4.1.8. TEC ve Nötropeni

Üç ila dört yaş arası küçük çocukların bir hastalığı olan çocukluk çağı geçici Eritblastopeni (TEC), kemik iliği aspirasyonunda anemi, retikülo sitopeni ve düşük kırmızı kan hücresi öncülleri ile belirlenebilir. TEC, immünokompetan çocuklarda en sık görülen kırmızı hücre aplazisi nedenidir ve diğer sitopeniler bu hastalarda giderek daha fazla farkına varılmaktadır [76]. B19, hematopoetik etkilerinden dolayı TEC hastalarında ilk şüphelenilen virüs olması nedeniyle birçok durumda ilk şüphe duyulan olmuştur. Birincil otoimmün nötropeni, granülosit spesifik oto-antikorlarından kaynaklanmaktadır. Primer otoimmün nötropeni ağırlıklı olarak bebeklik döneminde ortaya çıkar [77]. Çocukların kemik iliğinin B19 DNA'sının teşhisi için incelenmesi sonucunda, B19 enfeksiyonunun çocukluk çağında immün aracılı nötropenin ortak bir nedeni olabileceğini bulunmuştur. Ancak, son zamanlarda yapılan birçok çalışma bunu doğrulayamamaktadır [78].

2.4.1.9. Nörolojik Hastalıklar

Birkaç vakada, Eritma Infectiosum ile ilişkili nörolojik semptomlar bildirilmiştir. Parvovirus B19'a özgü antikorlar ve/veya DNA, ölümcül ve ölümcül olmayan ensefalopati vakalarının kan ve beyin omurilik sıvısında ve aseptik menenjitte saptanmıştır [79]. Nöropati (kompleks bölgesel ağrı sendromu) ve nöral gicamyotrofi B19 enfeksiyonu ardından gözlenmiştir. Beyin omurilik sıvısında IgM ve DNA'nın saptanması çok nadir görülen bir olay gibi görünmektedir. Nörolojik semptomlar için mekanizma bilinmemesine rağmen sıkça kızarıklık veya eklem ağrısı da belirti olarak gözlenir; bu durumda, nöropatinin immün sistemden etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir [80].

2.4.1.10. Miyokart İltihabı

Histolojik inceleme ve ölümcül miyositlerin çekirdeklerinde spesifik DNA'nın bulguları, hidrops fetalisin gelişimine neden olabilecek B19'un kardiyak tropizmini ortaya koymaktadır [81]. Birkaç çocuk ve erişkinde, klinik olarak anlamlı miyokardit ve perimyokardit teşhisi konmuştur [82]. Ayrıca, pediatrik kalp nakli alıcılarında, B19 enfeksiyonunun genel hastalıkların yanısıra miyokardit hastalığına da yol açtığı belirtilmiştir. B19'un hematopoetik kaynaklı hücrelerin sadece hızla bölünen hücrelerinde çoğaldığı düşünüldüğünden dolayı Miyokardit bulgusu kafa karıştırıcı olmuştur, ancak bu durum, miyositleri içeren viral reseptörün (P antijeni) dokulara dağılımları ile ya da immünolojik çapraz reaksiyondan virüs ve miyokard arasında paylaşılan epitoplardan yaralanılarak açıklanabilir [83]. B19'un yaygın bir enfeksiyöz ajan olduğu ve buna bağlı olarak miyokarditin nadir görülen bir olay olduğu düşünülürse ya virüs sadece hafif kardiyoeropiktir ya da diğer bilinmeyen ilgili faktörlerin klinik hastalığa neden olması gereklidir [84].

2.4.1.11. Hepatit

Hepatit vakalarında, B19 enfeksiyonu bugüne kadar net değildir. B19 enfeksiyonunda geçici karaciğer transaminaz yükselmesi nadir görülmesine de B19 enfeksiyonuna bağlı frank hepatit nadiren bildirilmiştir ve bu vakaların bazılarında, B19'un fulminan hepatitin nedeni olarak teşhisi sorgulanmaktadır [85]. Yüksek transaminazlı kan donörleri üzerine çalışmalar, B19'un seronegatif hepatitin ana nedenlerinden biri olduğunu doğrulamıştır [86]. Benzer şekilde, B19'un fulminan karaciğer yetmezliğinin olası bir etken maddesi olduğu PCR çalışmalarına da dayandırılarak ilgili aplastik anemi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür [87].

2.4.1.12. Varsayımsal İlişkiler

Parvovirus B19'un çeşitli klinik sendromlarda sorumlu ajan olarak önerildiği görülmüştür. Bu çalışmaların çoğu vaka raporlarına veya dokulardaki B19 DNA'nın PCR ile karşılık gelen kontrol grubu olmaksızın analizine dayanmaktadır. Kawasaki hastalığı taşıyan çocukların üzerine bir araştırmada %67 oranında B19 viremisi bulunmuştur [88]. B19'un neden olduğu diğer vaskülitik ve dermatolojik sendromlar

arasında purpura, trombotik renal greft mikroanjiyopatisi, Reynaud fenomeni, Henoch-schönlein purpura, poliartrit nodoza, eldiven ve çorap popüler purpürük sendromu, dermatomiyozit ve sistemik lupus bulunmaktadır [89]. Ağır pnömoni, konjunktivit, Behçet hastalığı, idiyopatik kollapse glomerulopati, kronik otoimmün trombositopeni, ornütropeni ve akut bir glomerülonefrit de B19 enfeksiyonunun olası belirtileri olarak öne sürülmüştür [90].

2.4.2. Bağışıklık Yetersizliği Bulunma Durumunda Enfeksiyon

2.4.2.1. Kronik Saf Kırmızı Hücre Aplazisi

Kalıcı kemik iliği yetmezliği nedeniyle nötralize bir antikor tepkisi oluşturamayan bağışıklık sistemi zayıflamış bir hastada, B19 enfeksiyonu kronik anemiye neden olabilir. Predispozan koşullar arasında nezelo sendromu, akut lenfositik lösemi, akut miyeloid lösemi, kronik miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom, Burkitt lenfoması, lenfoblastik lenfoma, miyeloid splastik sendromu, astrositom, wilm tümörü, HIV enfeksiyonu, SCID, kemik iliği transplantasyonu, organ transplatasyonu, steroid ve kanser kemoterapisi tedavisi ve antikor spesikliğinin bozulması ve nötralizasyonu [91]. Hastalarda persistan veya tekrarlayan viremi saptanan hastalar spesifik veya düşük seviyelerde spesifik antikorlara sahiptir [92]. Klinik belirteçler, yorgunluk ve solgunluğu içerirken, immün aracılı semptomlar (döküntü ve artralji) genellikle mevcut değildir [93]. Enfeksiyon altta yatan bir hastalığın ön belirtilerinin belirlenmesine yardım edebilir ve anemi, immünoglobülin veya antiviral kemoterapiden hemen sonra (HIV hastalarında) derhal havale edebilir [94].

2.4.2.2. AIDS

AIDS'li 50 hastayı içeren temel bir çalışmada, hiçbir viremi vakasında tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, HIV sero-pozitif hastalarda B19 kaynaklı aneminin prevalansı önemsiz olarak değerlendirilmiştir [95]. Buna göre, B19 DNA, serumda enfekte olmuş 30 hastadan beşinde (%17) HIV ile enfekte olmuş hematokriti olan hastaların 24'ünde ve 13 hastanın 4'ünde (%31) daha az olduğu tespit edildi. Hematokrit 20'nin altında veya eşit olan hastalar, B19'un HIV

enfeksiyonunda ciddi bir aneminin ortak bir nedeni olduğunu öne sürdüler. IgM'nin B19'a varlığı, aneminin geliştiği klinik durum ve morfolojisinin iliği kronik B19 enfeksiyonunun kötü tahmin edicileriydi [95].

2.4.2.3. Akut Lenfositik Lösemi

Lösemili yetişkin ve pediatrik hastaların raporlarında kronik B19 enfeksiyonu tanımlanmıştır ve Lösemili çocuklar B19 enfeksiyonlarında ağırlıklı grubu oluştururlar ve B19'un immün baskılanması nedeniyle oluşan hastalık etkilerine karşı savunmasız olabilirler [96]. Bir çalışmada, bakım kemoterapisi sırasında B19 seronegatif ALL hastalarının %8'i sero kaplanmıştı ve köklü bir B19 salgını ile çakışan bir grup vaka vardı [97]. B19 enfeksiyonu bir lösemik nüks veya tedaviye bağlı sitopeniyi taklit edebildiği ve enfekte olmuş kişilerin çoğunda kronik anemi ve derin trombositopeni gelişimine katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Nadiren de olsa izole trombositopeni veya daha önceden tedavi edilmiş geçici pansitopeni gözlenmiştir [98].

2.4.2.4. Virüsle Bağlantılı Hemofagositik Sendrom

Virüs hemofagositik sendromu (VAHS), sistemik bir viral hastalık ile bağlantılı olarak, belirgin hemofagositoz ve sitopeni ile ilişkilendirilen evrimsel hiperplazi ile karakterize edilmiştir. VAHS genellikle içinde histiyositik proliferasyonun geri dönüşümlü olduğu iyi huylu kendini sınırlayan bir hastalıktır. B19 enfeksiyonu, çocuklar ve yetişkinler arasında hematoagagositoz sendromu vakalarında saptanmıştır [99].

2.4.3. Kırmızı Hücreli Enfeksiyonu Olan Hastalarda Enfeksiyon

2.4.3.1. Geçici Aplastik Kriz (TAC)

Saf kırmızı hücre afazisinin kendi kendini sınırlayan kısa bir bölümüdür ve ilk olarak hemolitik anemili bir hastada tanımlanmıştır. Ancak, düşük kırmızı hücre üretimi veya yüksek yıkım veya kayıptan muzdarip olan herhangi bir kişi B19 enfeksiyonunun ardından aplastik kriz gelişme tehlikesiyle karşı karşıya kalacaktır.

Sağlıklı bireylerde enfeksiyon sırasında görüldüğü gibi, 10 ila 15 gün eritrosit üretiminin kesilmesi, hemolitik hastalarda, kırmızı kan hücrelerinin hayatta kalmasındaki azalmaya bağlı olarak hemoglobinde belirgin bir düşüşe yol açacaktır [100]. Hemoglobinopatiler, hastaları parvovirüs B19 enfeksiyonuna neden olmaz. Bunun üzerine yapılan bir çalışmada; Hemoglobinopatili ve normal kontrol hastalarında virüse karşı antikor prevalansının eşit olduğu gösterilmiştir [101]. Başka bir çalışmada ise, geçici bir plastik kriz geçirmiş orak hücreli anemili hastaların %70'inde parvovirüs B19 enfeksiyonu olduğu gösterilmiştir [102]. Jamaika hastalarının orak hücreli anemili çalışmasında, geçici aplastik kriz vakalarının tümü son parvovirüs enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur [103]. Geçici bir plastik krizde Viremia mevcuttur ve enfeksiyonu temizleyen antiviral antikorların ardından kırmızı hücre üretimi devam eder. Eritrositler prezentasyondan yoğun olarak etkilense de çoğunlukla saf kırmızı hücreli afazi, eş zamanlı trombositopeni, pansitopeni seyrek görülür [104]. Anemi ölümcül olabilse de aplastik krizin kendisi genellikle spesifik antikorların ortaya çıkmasıyla sona erer ve bu nedenle nadiren iki haftadan fazla sürer. Hemoglobin yolu olan çocuklarda aplastik krizin %70 ila 80'i solgunluk, güçsüzlük ve uyuşukluk ile kendini gösteren B19 enfeksiyonundan kaynaklanır [105]. Ağırlıklı olarak çocukları etkileyen ve yaşamdaki benzersiz bir olayı betimleyen yıllık vaka oranları %1-5 arasındadır [105].

2.5. B19'un Epidemiyolojisi

Birkaç ülkede yapılan sero-epidemiyolojik çalışmalar B19 enfeksiyonunun yaygın olduğunu göstermektedir. Çocukların yaklaşık %50'sinde, 15 yaşına kadar saptanabilen parvovirüs B19 spesifik IgG antikorları bulunur ve yetişkinlerin %50 ila 80'i seropozitifdir. Çocuk doğurma çağındaki kadınlar arasında yıllık sero-versiyon oranı, endemik dönemlerde %1,5 ve salgınlarda %13 olarak tahmin edilmektedir [106]. Enfeksiyon ilkbahar ve kış ayının geç dönemlerinde daha sık görülmektedir. Parvovirus DNA'sı veremi zamanında solunum sekresyonlarında bulunduğundan, solunum yolu yayılımının en sık görülen bulaşma yolu olduğu düşünülmektedir. Virüs, yakın temasla kolayca bulaştığı düşünülmektedir; Ev-halkı ile temas oranı %50'ye yaklaşırken, okul ve kreşde ise oranın %10-60 olduğu bildirilmiştir. Virüs serumda yüksek titrelerde bulunduğundan ve geleneksel ısı işlemlere dirençli olduğundan, kan ürünlerinden bulaşma meydana gelmiştir. Nozokomiyal virüs

bulaşması da belgelenmiştir [107]. Ayrıca, B19 kan ürünlerinin, kemik iliği nakillerinin (19) ve böbrek nakli gibi katı organ nakillerinin transfüzyonu yoluyla da bulaştığı belirlenmiştir [107, 108, 109].

2.6. B19 Teşhisi

2.6.1. Tanısal Sitopatoloji, Elektron Mikroskobu ve İmmünohistokimya

B19V'nin neden olduğu sitopatolojik anormallikler karakteristiktir ancak tanısal amaçlar için yeterli değildir. Aktif B19V enfeksiyonu, kemik iliğinde dev pronormoblast oluşumunu indükler; bunlar sitoplazmik vakumlama, çekirdeğin buzlu cam görünümü ve şeffaf perinükleer halo ile karakterize edilir. Kromatin çoğu zaman olgunlaşmamış ve viral kapsama çevresinde ince bir halka gibi görünmektedir. Sitolojik yöntemler, şüpheli hidropların sitopatolojik değerlendirmesinde faydalı olabilir [110]. Ayrıca, B19V plazma ve fetal dokularda, özellikle akut enfeksiyon sırasında yüksek titre viremi vakalarında elektron mikroskopu kullanılarak tespit edilebilir [104, 111]. Ancak, elektron mikroskobu teknik olarak karmaşık bir yöntemdir ve rutin amaçlar için kullanılamaz. İmmünohistokimya, tanı amaçlı kullanılabilir, ancak zaman alıcı bir yöntemdir. Dilate kardiyomiyopati veya enflamatuar miyokard hastalıkları olan hastalarda, B19V'nin nedensel bir ajan olarak düşünüldüğü zaman, immünohistokimya, B19V VP1/VP2'nin miyokardiyumda görüntülenmesini sağlar [112]. İmmünohistokimya, hidropik fetüslerden (akciğerler, karaciğer, timus, böbrekler, kalp ve plasenta) farklı doku materyallerinin patolojik incelemesi için de kullanılabilir [113].

2.6.2. Serolojik Yöntemler

B19 ile yakın zamanda veya geçmişte enfeksiyonun kesin teşhisi, plazmadaki anti-B19 IgM ve IgG'nin saptanması için enzim immünoassaylarının kullanılmasına bağlıdır. Bakulovirüs sisteminde B19 kapsid proteinlerinin (VP1 ve VP2) ekspresyonu kullanılarak ticari deneyler geliştirilmiştir [114]. Bakulovirüs sisteminin genel avantajı, çözünür ve konformasyonel tam kapsid proteinlerinin üretimi için gerekli olan translasyon sonrası protein katlanmasını indüklemeye kabiliyetidir. Bu, immünoassayların duyarlılığı için kritik öneme sahiptir, çünkü proteinler

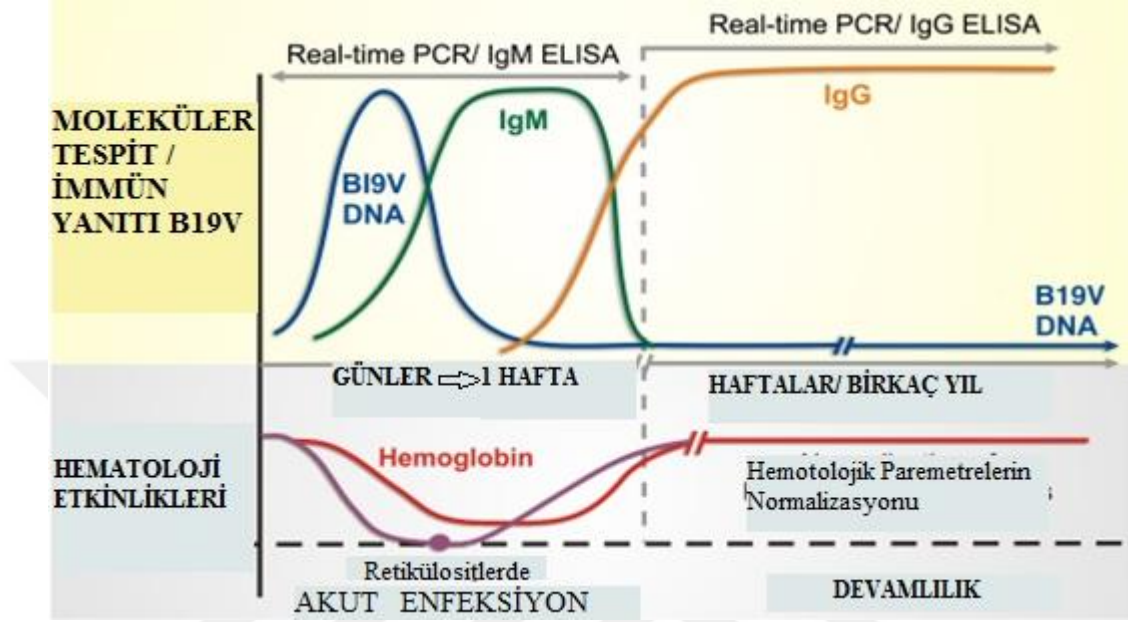
konformasyonel epitoplarını korurlar ve hatalı negatif sonuç riski daha azdır [108, 115]. Akut B19 enfeksiyonunu doğrulamak için, IgM antikorlarının plazma veya serumda tespit edilmesi gerekir. Bu antikorlar, yüksek titre viremisinden yaklaşık 7-10 gün sonra sentezlenir ve VP1 ve VP2'nin lineer ve konformasyonel epitoplarına karşı yönlendirilir. VP1 konformasyonel epitoplarına karşı IgM tepkisi baskındır, doğrusal VP2 antijenine karşı IgM daha az sıklıkla bulunur. VP1 ve VP2 konformasyonel epitoplarına ve VP1 linear epitoplarına karşı IgM antikorları aynı anda görünür, ancak lineer VP2 epitoplarına karşı IgM antikorları hızla azalır. Bu nedenle, son B19V enfeksiyonunun tanısı için tek başına VP1/VP2 doğrusal antijenlerin kullanılması yanlış negatif sonuçlar verebilir [109, 116]. Şu anda, B19 IgM'nin hazırlanmasında Uluslararası bir standart yoktur. IgM üretimindeki düşüş, IgG antikorlarının gelişimi ile takip edilir. Yaşam boyu kalıcılık ve koruyucu fonksiyonlara sahip olmalarına rağmen IgG'nin VP2'nin lineer epitoplarına karşı yönlendirilir ve hızla kaybolurlar. Benzer şekilde, VP1'in lineer epitoplarına karşı yüksek derişimde antikorlar da gözlenir. Bu, anti-B19V IgG'nin immünolojik tespiti için en az bir tane doğal antijenin gerekli olduğunu ortaya konulmaktadır [117]. IgM sınırlamalarının aksine, değişken test sistemleri kullanan farklı laboratuvarlar arasında önceden enfekte olmuş B19V enfeksiyonunun doğru doğrulanması için değerli bir araç olan IgG için bir Uluslararası Standart [2. Uluslararası Standart 2003; kod 01/602] vardır [118].

2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Serum ve fetal dokularda B19 saptamasına yönelik ilk PCR yöntemleri 1989'un başlarında ortaya çıkmıştır [112, 119]. Günümüzde B19V tespiti için kullanılan çok sayıda primer ve genom hedefi olan çok çeşitli moleküler yöntemler vardır. B19V'nin kendisi, yılda bir site başına 10^{-4} 'ten fazla bir hızla gelişmektedir [113, 120]. Bu, uygulanan moleküler test sistemlerinin, özellikle kullanılan primerlerin ve hibridizasyon problemlerinin duyarlılığını etkileyen önemli B19V varyasyonunu göstermektedir. Diğer bir dikkat edilecek nokta ise, B19V'nin uzun süre sağlıklı deneklerin kan veya kemik iliğinde devam edebilmesi ve viral DNA'nın PCR tespitinin, viral yükün bozulmasını basit bir şekilde yansıtabilmesidir. Bu nedenle, B19V DNA'nın kalitatif PCR ile kalitatif tespiti, son enfeksiyonları doğrulamak için geçerli bir tanı yöntemi değildir [121]. Ayrıca, ticari analizlerin çoğu, sıklıkla yanlış

tanı konulan veya daha az dikkate alınan genotip 2 ve 3'ten ziyade, B19V'nin 1 numaralı genotipini tespit ederler [122]. Bu nedenle, B19 için nükleik asit amplifikasyon teknolojisi (NAT) tahlili, kesin bir standardizasyon gerektirir. Uygun doğrulama sağlamak, laboratuvarlar tarafından kullanılan farklı testler arasındaki belirsizliği azaltmak ve B19V DNA ölçümü için uluslararası kabul görmüş standart bir ünite oluşturmak için iyi tanımlanmış referans materyalleri gereklidir [123]. Bu problem şu anda Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) B19V DNA amplifikasyonu için geliştirdiği uluslararası standardını oluşturmasıyla aşılmıştır [124]. 2010 yılında, NAT deneyleri ve B19V DNA için birinci WHO Uluslararası Standardı (kod 99/800) ikinci WHO Uluslararası Standardı (kod 99/802) ile değiştirildi [125]. Bu standardize edilmiş PCR kantitatif kontrolü, sadece optimizasyon moleküler tanı prosedürleri için değil, aynı zamanda plazma minipoollerinin ve çeşitli kan ürünlerinin taranması için başarılı bir şekilde uygulanabilir, böylece transfüzyonların ve hematolojik tedavinin güvenliğini artırır [126]. Rutin B19V genotipleme, transfüzyonla bulaşan durumlarda eşit sekansları izleyebildiği için viral tanı için önemli bir konudur [127]. B19V viral yükünün miktar tayini kan bağışlarının kontaminasyonunu önlemek açısından önemlidir. Günümüzde, birçok Amerika Birleşik Devletleri plazma fraksiyonatörü, virüsü tespit etmek ve bunun sonucunda bir B19V DNA viral yükü ile 106 IU/mL-1'ye kadar olan bir B19V DNA viral yükü ile yapılan bağışları hariç tutmak için minipool B19V NAT taramasını gerçekleştirmektedir, böylece plazma türevlerinin üretimi için hazırlanan plazma havuzlarının imalatında B19V DNA seviyesi 107 IU/mL-1'i [128] geçmemelidir. Minipool, B19V algılama ile ilişkili maliyeti azaltmak için bireysel numune testlerine göre daha avantajlıdır. Bununla birlikte, B19V PCR saptama sistemlerinin aşırı duyarlılığına rağmen, birleşik maliyet, tarama sırasında çapraz kontaminasyona ve potansiyel olarak genotipler 1, 2 ve 3 arasındaki dizi farklılıkları nedeniyle hatalı negatif PCR olasılığına yol açan son derece yüksek viremi titreleriyle bir araya gelmiştir. Bu durum, kan bağışlarının taranması için alternatif stratejilerin göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir [129]. NAT B19 test sistemleri, üç viral genotipin hepsini de tespit etmeli ve nicel olarak tanımlamalıdır [ABD Gıda ve İlaç İdaresi, 2008]. B19V'ye duyarlı algılama için ortaya çıkan bir alternatif, domuz parvovirüslerinin tespiti için başarılı bir şekilde uygulanan loop aracılı izotermal amplifikasyon olabileceği belirtilmiştir. TaqMan gerçek zamanlı PCR ile

karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyet gösterir, ancak virüsü yeterince ölçebilme yeteneği şüphelidir [130]. B19 enfeksiyonunun patogenezi sırasında farklı tanı prosedürlerinin kullanımı gösterilmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. B19'a moleküler immün yanıt [130].

2.7. B19'a İmmün Yanıt

2.7.1. Doğal Bağışıklık

Doğuştan gelen bağışıklığın B19 enfeksiyonunun karşılaştırılmasındaki rolü detaylı olarak araştırılmamıştır. Genel olarak, diğer virüsler gibi, B19 da PAMP'leri vasıtasıyla hücresel PRR'ler tarafından tanınabilir, ancak virüsün hangi bileşeninin PAMP'lar olarak etki edebileceği tanımlanmalıdır. Viral genom, uyarıcı dizilerden yoksundur; bununla birlikte, terminal bölgeleri GC bakımından zengindir ve muhtemelen TLR9 gibi reseptörler tarafından tanınabilir. CpG-ODN2006, patlama oluşturan birim-eritroid büyümesini seçici bir şekilde önleyen ve S ve G (2)/M fazlarında hücrelerin birikmesini ve apoptotik hücrelerin hücre boyutu ve sıklığında bir artış meydana getiren ve apoptotik hücrelerin hücre boyutunda ve sıklığında bir artışa neden olan insan parvovirus B19V ile enfekte eritroid progenitörlerinde bulunan fosfodiester iskeletine sahip bir TLR9 ligandıdır. B19V'nin P6-promotör bölgesinde de bulunan bir konsensüs sekansı, sekansa özgü bir şekilde eritroid

büyümesini inhibe edebilir ve eritropoietin reseptörünün ekspresyonunu aşağı doğru düzenler, ayrıca B19-DNA tarafından indüklenerek etkilenir. Her ne kadar TLR9 mRNA'ları ODN 2006 ile uyarılarak yukarı regüle edilmese de, bu sonuçlar eritropoezisin inhibisyonunun olası farklı mekanizmalarına işaret etmektedir [131]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, EGFP ile kaynaşmış NS ve VP proteinleri üreten, farklı ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinde benzeri reseptörlerin ekspresyonundaki değişimi incelenmiştir. Bu sistemde, NS ve TLR9'un hem kısa hem de uzun vadeli yükselişini indüklemesinde ve bazı etkilerin VP2 proteini tarafından da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. NS ve VP2'nin savunmaların ve TLR'lerin uyarılması üzerindeki farklı etkileri, B19V'nin doğuştan gelen bağışıklık üzerindeki rollerini anlamada bir ipucu sağlayabileceği önerilmektedir [132].

2.7.2. Kazanılmış Bağışıklık, Antikorlar

Antikorlar, B19V'ye Kazanılmış bağışıklık tepkisinin ayırt edici özelliğidir. Naif bireylerde, B19'a özgü bir antikor enfeksiyondan hemen sonra üretilir ve virüs enfeksiyitesini nötralize edebileceği ve aşamalı olarak enfeksiyonun temizlenmesine yol açabileceği varsayılır. İlk önce IgM üretilir ve enfeksiyondan sonra genellikle yaklaşık 3-6 ay sürebilir, bunu kısa bir süre sonra uzun ömürlü olduğu tahmin edilen IgG üretimi izler. IgA ayrıca vücut sıvılarında da tespit edilebilir. Viral kapsid proteinleri, bağışıklık sistemi tarafından tanınan ve nötrleştirici aktiviteye sahip antikorların üretimini indükleyen ana antijenlerdir. Antijenik bir bakış açısına göre, viral kapsid proteinleri, VP ortak bölgesinde veya VP1u bölgesinde epitoplara gösterir. Ortak bölgedeki epitoplara esas olarak konformasyoneldir ve kapsid yüzeyinde dağılmış birkaç bölgede haritalanmıştır, VP1u bölgesindeki epitoplara esas olarak doğrusaldır ve N-terminusa yakın eşlenmiştir [133,134]. İmmün tepkinin gelişimi tipik olarak bir akut faz epitopunun tanınmasını ve ardından daha yüksek avidite antikorların gelişimini gösterir [135, 136]. Etkili immün tepki en sık olarak anti-VP2 konformasyonel ve VP1u lineer epitoplarına yönelik antikorların varlığını gösterir [137]. Ayrıca, NS proteinine karşı antikorlar B19 enfeksiyonuna bir tepki olarak üretilir. Bunlar, popülasyon gruplarına bağlı olarak değiştiği bildirilen frekanslarda, kapsid proteinlerine karşı antikor gösteren bireylerin bir alt popülasyonunda tespit edilebilir. NS proteinlerine karşı antikorlar muhtemelen uzun

sürekli antijenik stimülasyonun bir sonucu olarak üretilir, ancak varlıkları kesin olarak herhangi bir enfeksiyon veya klinik durum seyrine bağlı değildir [138]. B19V proteinlerine karşı immün reaktivite, NS proteinini kapsayan lineer peptitlere karşı antikor reaktivitesi veya kapsid proteinleri içindeki seçilmiş antijenik bölgeleri temsil eden serum B19 IgG-pozitif bireylerin serumlarını değerlendirerek ayrıca araştırılmıştır. Bu yaklaşımla, NS proteini üzerinde üç yeni antijenik bölge tanımlanmış ve VP1u ve VP ortak bölgesinde üç ana antijenik belirleyici eşleştirilmiştir [139].

Nötralize edici bir aktivitenin gelişimi, olgunlaşmamış ve etkili bir immün tepkisi tipiktir, oysa tamamlanmamış nötralize edici aktiviteye sahip antikorlar, kalıcı enfeksiyonların tipik halidir. Viral kapsid proteinlerine karşı yönlendirilmiş antikorların varlığının sekonder enfeksiyonlardan koruduğu varsayılmaktadır ve bunun bir aşının geliştirilmesinin mantığını teşkil ettiği varsayılmaktadır. Ardından, gönüllü donörlerde B19'a özgü B hücre hafızasını değerlendirmek için B hücresi enzimine bağlı immün spot testi kullanılmıştır. Sonuç olarak, bir B hücre belleğinin VP2'nin konformasyonel epitoplarında tekrar tutulduğu ve VP2'nin lineer epitoplarına karşı ise tutulmadığı gösterilmiştir. Eşsiz VP1 bölgesine karşı IgG için seronegatif olan bireyler, B19'a tekrar maruz kaldığında humoral bir tepki verme potansiyeli olan B hücre hafızası belirlenebilir. B hücre hafızasının, VP2'nin yapısal epitoplarına karşı ve VP1'in lineer epitoplarına ve VP2'nin lineer epitoplarına karşı değil, farklı B19 antijenlerine karşı serum reaktivitesinin test edilmesi sonucu elde edilen gözlemler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir [140].

2.7.3. Kazanılmış Bağışıklık, Hücre

B19 enfeksiyonuna karşı T hücresi aracılı immün tepkileri, ilk olarak, rekombinant VP1, VP2 ve NS proteinleri tarafından *in vitro* stimülasyonun ardından periferik kan tek çekirdekli hücrelerinin proliferatif tepkileri ölçülerek gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, HLA sınıf II molekülleri tarafından CD4 + T hücrelerine sunulan, VP1 ve VP2 kapsid proteinlerine karşı yönlendirilen B19V'ye özgü hücresel bağışıklığın varlığını göstermiştir [141].

2.7.4. Edinilmiş Başıklık Hücreleri

B19 enfeksiyonuna karşı T hücresi aracılı immün yanıtları ilk olarak, rekombinant VP1, VP2 ve NS proteinleri tarafından *in vitro* stimülasyonun ardından periferik kan mononükleer hücrelerinin proliferatif tepkileri ölçülerek gösterilmiştir. Sonuçlar, HLA sınıf II molekülleri tarafından CD4⁺ T hücrelerine sunulan, VP1 ve VP2 kapsid proteinlerine karşı yöneltilen B19V'ye özgü hücresel başıklığın varlığını göstermiştir [141]. B19V VLP antijeni tarafından stimülasyona bir cevap olarak T-hücresi çoğalması daha sonra yakın zamanda uzak B19V enfeksiyonu olan hastalarda doğrulanmış ve ölçülmüştür, B19V'ye özgü, HLA sınıf II ile sınırlı CD4⁺ hücre yanıtlarının, yakın zamanda enfekte olmuş hastalar arasında en kuvvetli şekilde tespit edilebildiğini ancak akut faz içinde sınırlanmadığını gösterilmiştir [132, 142]. Epitopa spesifik hücre aracılı immünitenin tespiti için farklı bir yaklaşımın ardından, B19V NS proteininin bütün kodlama sekanslarını ve *in vitro* stimülasyonun ardından spesifik CD8⁺ T hücre proliferatif tepkilerini ve sitolitik aktiviteyi tespit etmek için kullanılan peptitleri kapsayan bir peptid kütüphanesi tasarlanmıştır. Bu yaklaşımla, NS proteinden tek bir HLA-B35-kısıtlı CD8⁺ T-lenfosit epitopu tanımlanmıştır, işlevsel önemi ayrıca bir IFN- γ Elis pot deneyi kullanılarak *ex vivo* deneylerde de doğrulanmıştır. Bu epitop, B19V-seropozitif donörlerde kuvvetle immünojenikti ve normal bireylerde kalıcı antijen stimülasyonu olduğunu göstermiştir [143].

T hücresi epitoplarını haritalandırmak için daha kapsamlı bir yaklaşımda, yapısal olmayan protein NS, VP1 eşsiz bölgesi ve yapısal proteinlerin ortak VP1/VP2 bölgesini kapsayan toplam 210 örtüşen peptid sentezlenmiştir. Bu peptitler, fonksiyonel ilişkilerini değerlendirmek için *in vitro* sitotoksiste ve *ex vivo* stimülasyon analizlerinde kullanılmıştır. HLA kısıtlamaları önce siliko olarak tahmin edilmiştir ve sonra deneysel olarak doğrulanmıştır. Bir dizi CD8⁺ T-hücresi epitopu tanımlanabilmiştir, bunlardan dokuzu NS proteininde ve biri VP ortak bölgesinde bulunmaktadır. Akut enfeksiyonlu bireylerde bu epitoplara geniş CD8⁺ T-hücre yanıtları gözlenmiştir ve bu yanıt akut hastalığın çözülmesinden aylar sonra korunmuş hatta artmıştır. Daha sonra, CD8⁺ T hücrelerinin B19 enfeksiyonunun kontrolünde belirgin bir rol oynadığı görülmüştür. Sürekli olarak enfekte olmuş bireylerde bir tutarsızlık gözlenmiştir; viral kapsid protein epitoplarına karşı nispeten daha yüksek bir reaktivite gözlenmiştir [144].

CD8⁺ hücrelerinin merkezi rolü; B19'a özgü CD8⁺ T-hücresi tepkilerinin kapsamı ve fenotipinin, HLA ile sınırlı, spesifik peptit multimerik kompleksleri kullanılarak incelenen akut yetişkin enfeksiyonu sırasında ve sonrasında tanımlanmasıyla teyit edildi. Sonuçlar, %4'e kadar CD8⁺ T hücresi içeren epitoplara özgü T hücresi popülasyonları ile klinik semptomların çözülmesine ve viremi kontrolüne rağmen enfeksiyondan sonraki ilk yılda büyüklükle artması sürekli cevapların varlığını göstermiştir. Bu hücreler güçlü efektör fonksiyonuna ve sağlam proliferatif kapasiteye sahiptir. B19'a özgü sitotoksik T lenfositleri, enfeksiyondan yıllar sonra test edilen kişilerde, tipik olarak olgun bir fenotip gösteren CD8⁺ T hücrelerinin tipik olarak %0,5'inden daha düşük frekanslarda tespit edilebilir [145]. Ayrıca, HLA kısıtlaması, tek bir viral epitopun immün dominantlığı ve T-hücresi reseptörünün odaklanmış kullanımı gösteren, akut enfekte bir grup hastada güçlü ve seçici bir CD8⁺ tepkisi görülmüştür. Yüksek derecede odaklanmış bir T hücresi tepkisi, düşük virüs seviyelerinin bile hızlı tanımlanmasına ve ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilmektedir ve viral enfeksiyonun etkin kontrolü için çok önemli olabilmektedir [136, 146] Yardımcı T hücrelerinin B19V'ye immün yanıtta rolü ilk olarak iki yapısal protein olan VP1 ve VP2 (VP1/2 kapsid) veya yalnızca VP2 (VP2 kapsid) içeren rekombinant VLP'lerin ve prokaryotik bir sistemde eksprese edilen VP1u bölgesini kullanarak araştırılmıştır. Bu antijenlerin Th hücrelerini çoğalma ve IFN- γ ve IL-10 salgılaması için uyarma kabiliyeti B19V ile enfekte olmuş kişilerde ölçülmüştür. Benzer çoğalma, IFN- γ ve IL-10 yanıtları VP1 / 2 ve VP2 kapsid antijenleri ile bulunmuştur. B19'a özgü IFN- γ tepkileri hem yakın zamanda hem de uzak enfeksiyonda genellikle IL-10 tepkilerinden daha güçlü olduğu görülmüştür ve tekrarlayan veya devam eden semptomları olan hastalar çarpıcı şekilde daha düşük IL-10 tepkileri göstermiştir. VP1u'ya özgü IFN- γ yanıtları yakın zamanda enfekte olmuş denekler arasında çok güçlü olduğu görülmüştür ancak uzaktan enfekte olmuş denekler arasında, anti-VP1u antikollarının belgelenmiş kalıcılığıyla çelişen bir bulgu bulunmamaktadır [137, 138, 147, 148].

Örtüşen peptitler ve IFN- γ immün-nokta deneyleri de kapsid proteinlerine CD4 + T-hücresi tepkisinin büyüklüğünü ve derecesini araştırmak için kullanılmıştır. Yine, akut enfekte olmuş bireylerde verilen yanıtlar, uzaktan enfekte olmuş bireylerde verilenlerle karşılaştırılmıştır. Akut enfeksiyonlu bireylerin, birkaç peptid havuzuna

geniş CD4 + tepkileri verdikleri, VP ortak bölgesinden peptitlere karşı en güçlü tepkileri ve akut sonrası enfeksiyon zamanı ile ilişkili olarak büyüklüğünde bir azalma olduğu bulunmuştur. *In vitro* stimülasyon analizleriyle, uzaktan enfekte olmuş bireylerde geniş bir CD4⁺ spesifik tepkisi de tespit edilmiştir, bu durumda VP ortak bölgesinde tek bir baskın epitopu kanıt olarak ortaya konmuştur. B19'a özgü CD4 + hücrelerinin fenotipik analizi, CD4 hücrelerinin esas olarak merkezi bellek fenotipine sahip olduğunu ve böylece CD8 hücrelerinde görülen evrimlerden ayrıldığını göstermiştir. Bu fark, B19V enfeksiyonunun patogenetik mekanizmalarının tanımlanması ile de ilgili olabilir, böylece CD4 hücrelerinin akut fazda aktivasyonu, ancak antikorların geliştirilmesinde işlevsel olan, ayrıca klinik belirtilerin gelişimine veya hatta gelişimine katkıda bulunabilmektedir. İmmün patolojik veya otoimmün süreçler, bir CD8 immün tepkisinin gelişmesi diğer yandan viral replikasyonu sınırlar, bu nedenle CD4 aktivasyonunu azaltır ve sonuçta viral kalıcılığın kontrolüne katkıda bulunmaktadır [149].

Akut enfeksiyon veya kalıcı enfeksiyon sırasında pro-enflamatuar ve T yardımcı Th1/Th2 sitokin tepkilerinin karakterizasyonu akut ve sürekli olarak enfekte olmuş deneklerde gerçekleştirilmiştir. Akut B19 enfeksiyonunun başlangıcında pro-enflamatuar sitokinlerin ilk pikleri (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-8) bulunmuştur. Th1 tip sitokinlerin indüksiyonu IL-2, IL-12 ve IL-15, erken evrede zaten görülmüş ve takip süresi boyunca birçok hastada sürdürülmüştür. Buna karşılık, TH2 tipinde bir immün tepkisi (IL-4, IL-5 ve IL-10) ve ayrıca bir IFN- γ tepkisi ile ilişkili sitokinler gözlem süresi boyunca düşük kalmıştır. Th2 sitokinlerin bulunmamasına rağmen, hastalar normal B19'a özgü IgG seviyeleri geliştirmişlerdir, bu nedenle antikorlar düşük dereceli bir IL-6 yanıtının yanı sıra diğer sitokinler, örneğin, TGF- γ ile uyarılmış olabilmektedir [140, 150]. Her şey hesaba katılırsa, B19 spesifik T-hücre yanıtları, litik enfeksiyonlara yatkın virüslere özgü tipik özellikleri birleştirmektedir ve ayrıca bağışıklık sistemi tarafından sürekli bir sürveyans gerekliliği ile kalıcı bir enfeksiyon oluşturma yeteneğine de sahiptir. Bu kavram, B19'a ev sahibiyle uzun süreli bir ilişki kurabilen bir virüs olarak görüşümüzü güçlendirmektedir, Sonuç, virüsün patojenik potansiyeli ile bağışıklık sistemi tarafından işletilen kontrol mekanizmaları arasındaki etkileşime ve dengeye bağlanmaktadır. Son olarak, farklı fenotiplerin HLA kısıtlama tanımı ve ilgili hücrelerin aktivasyon profilleri ile immün

yanıtın diseksiyonu, sadece enfeksiyon seyri konusundaki bilgilerimiz için değil, aynı zamanda B19 aşısının geliştirilmesi gibi terapötik ve profilaktik seçeneklerin geliştirilmesi için de çok önem taşımaktadır [151].

2.8. Tedavi

Çoğu durumda beşinci hastalık tedavi gerektirmez, B19 kaynaklı artraljili bazı hastalarda semptomatik tedavi gerekebilmektedir. B19'un neden olduğu geçici aplastik kriz durumlarında eritrosit transfüzyonu ile tatmin edici bir hemoglobin konsantrasyonu elde edildiğinde prognoz mükemmeldir [152]. Gebelikteki seronegatif kadınlarda B19 enfeksiyonu haftalık ultrason muayenesi ile izlenmelidir ve kordosentez ve intrauterin transfüzyonlar, hidrop fetalis vakalarında mortaliteyi azaltmada etkili olmaktadır. Kalıcı B19 enfeksiyonunun etkili tedavisi (saf kırmızı hücre aplazisi), immünoglobulin infüzyonundan (5 gün boyunca günde 0.4 g/kg vücut ağırlığı / gün ya da 2 ila 3 gün boyunca 1g/kg / gün) oluşmaktadır. Yetişkin popülasyonun çoğunluğu virüse maruz kaldığından iyi bir nötralize edici antikor kaynağıdır. Bu tedavi genellikle iyileştiricidir [105, 107].

Retikülosit sayısında belirgin bir artış ve buna bağlı olarak hemoglobinde artışa neden olmaktadır. Daha deneysel bir notta, B19 proteinlerine yönelik nötrleştirici insan monoklonal antikorlarının üretilmesi, kronik olarak enfekte olmuş kişilerin immünoterapisi olarak önerilmiştir [153].

2.9. Parvovirus B19 ve Böbrek Nakli

Böbrek nakli sırasında, 1980'li yılların ortasından beri kalıcı anemi veya PRCA olarak ortaya çıkan B19 enfeksiyonu tanımlanmış ve bugüne kadar en az 21 ya da daha fazla vaka belgelenmiştir. Bununla birlikte, değişken olduğu bildirilen böbrek nakli alıcılarında aktif B19 enfeksiyonunun görülme sıklığını değerlendirmek için sadece birkaç çalışma yapılmıştır (%0-6.3) (5-7), anemi ile başvuran hastalarda daha yüksektir (%23). Ek olarak, böbrek nakli alıcılarında B19 enfeksiyonunun klinik önemi, asemptomatik enfeksiyondan anemiye, PRCA'nın çökmekte olan glomerulopatisine ve allograft fonksiyon bozukluğuna kadar geniş bir klinik belirtiler yelpazesiyle hala net değildir [154].

Kronik anemi böbrek nakli hastalarında önemli bir sorundur. Anemik hastaların yüksek dozlarda intravenöz immünoglobulin (IVIG) ile immünosupresyonun azaltılması ile birlikte tedavisi semptomatik enfeksiyonun iyileşmesine neden olabilir, fakat B19 eradikasyonunda olmayabilir. Renal transplant donörlerinde ve alıcılarında B19 enfeksiyonunun sıklığı, bunun için rutin klinik teşhis eksikliği nedeniyle hafife alınmaktadır ve anemi genellikle immünosupresif ilaçlara atfedilmektedir [155].

Tespit edilebilir B19'a özgü IgG'ye sahip olan immünokompetan birçok kişi, tamamen asemptomatiktir veya bir üst solunum yolu hastalığının spesifik olmayan semptomları göstermektedir. Nakli alıcılarında bastırılmış bağışıklık sistemi göz önüne alındığında, çoğu akut B19 enfeksiyonunun klinik semptomlarından yoksun olabilmektedir. Sağlıklı yetişkinler arasında geçmiş Parvovirus B19 enfeksiyonunun yüksek sıklığını destekleyen kanıtlar olmasına rağmen (serolojik bulgulara göre %60-85) nakil alıcı popülasyonda Parvovirus B19'un serolojik prevalansı ile ilgili veri azlığı görülmektedir [155].

Böbrek naklinde parvovirus B19 prevalansı ile ilgili çalışmalar bol değildir, ancak bu çalışmaya benzer çalışmaların çoğunu ele alınmaktadır ve bu araştırmadaki ana konuya odaklanarak, araştırmada kullanılan yöntemi dikkate almadan, böbrek nakli hastaları arasında parvovirus B19 prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Virüsün tespitinde, enzimatik tahlilde (ELİSA) ve DNA (gerçek zamanlı PCR) kullanılarak tespitde yaygın olan iki yöntem bir araya getirilmeye çalışılmıştır. Farklı ülkelerde yayınlanan çalışmaların bir kısmını ve sonuçlarını gözden geçireceğiz;

Bu çalışmalardan biri, Ekim 2003 ile Ocak 2004 arasındaki dönemde Güney Kore'nin Seul şehrinde yapılmıştır ve parvovirüs B19 DNA'sını saptamak için gerçek zamanlı PCR tekniği ile 167 böbrek nakli alıcısı dahil edilmiştir, ilk kan örnekleri, nakil sonrası iki hafta içinde elde edilmiştir ve takip eden üç örnek iki aylık aralıklarla toplanmıştır. Niteliksel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanan parvovirüs B19 insidansı ve hemoglobin düzeyinin retrospektif olarak gözden geçirilmesi yoluyla B19 enfeksiyonunun klinik önemi araştırılmıştır. 167 Böbrek nakli alıcısından toplanan 537 örnek ve parvovirüs B19 pozitif oranı genel olarak (%18,3) olarak bulunmuştur. 167 Böbrek nakli alıcısının elli ikisi

(%31,1) en az bir pozitif göstermiştir. 167 Böbrek nakli alıcısının elli ikisi (%31,1) en az bir pozitif göstermiştir. Hemoglobinin düzeyi, negatif veya bir pozitif PCR olanlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Çalışma, Böbrek nakli alıcılarında B19 enfeksiyonunun nadir olmadığı ve böbrek nakli sonrası düşük HB ve saf kırmızı hücre aplazisi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [156].

Çin'de C.XI vd. tarafından yapılan bir başka çalışmada, Ağustos 2009'dan Şubat 2010 tarihleri arasında transplantasyondan 1-18 ay sonra 114 hasta yer almıştır. Genel popülasyondan seksen dokuz gönüllü kontrol grubu olarak ortalama 37.69 ± 10.92 yaş (113 erkek, 41 kadın) seçilmiştir. B19 IgM ve IgG, ELISA kullanılarak kontrol ve böbrek nakli alıcıları arasında ölçülmüştür. Serum B19 DNA kopya sayısı gerçek zamanlı PCR kullanılarak ölçülmüştür. B19 IgG ve IgM, üreticinin talimatlarına göre ticari ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Enfeksiyon için şüpheli enfeksiyon olduğunu belirten optik yoğunluk (OD) değeri numunesi / kesme ≥ 1 yeniden ölçülmüştür. Bir OD değeri (S) / CO <1 negatif olarak kabul edilmiştir. 144 böbrek nakli alıcısı arasında, takip sırasında B19 enfeksiyonu tanısı alan 28 hasta (%18,75), bu aynı dönemde genel popülasyona göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Enfekte hastalar etkilenmemiş hastalara göre, önemli ölçüde daha düşük hemoglobin değerleri, daha yüksek serum kreatinin konsantrasyonları ve daha düşük glomerüler filtrasyon hızlarına ek olarak, anemi ve idrar anormallikleri görülmüştür. 2 grup, kalsinörin inhibitörü (CNI) immün baskılayıcı tiplerinde veya dozlarında farklılık göstermemiştir. Enfekte olan grupta kemik iliği biyopsisi kullanılarak doğrulanan iki saf kırmızı hücre aplazisi (PRCA) olgusu gözlenmiştir. Renal biyopside HPV B19 DNA kopya numaraları 107 / mL ve segmental mesangial hücre proliferasyonu göstermiştir. PRCA vakaları immünomodülatör tedavi ile tedavi edilmiştir. Çalışma, B19 enfeksiyon oranının böbrek nakli alıcıları arasında normal kontrollerden anlamlı derecede yüksek olduğu sonucuna varmıştır. Enfeksiyonlar, sırayla PRCA'ya yol açabilecek renal allograft hasarına bağıntılıdır. İmmünomodülasyon tedavisi, B19 enfeksiyonunun bu komplikasyonunu tedavi etmede etkili olmuştur [157].

Çalışma İran'da gerçekleştirilmiştir. Dokuz böbrek nakli alıcısı, Urmiye İmam-Humeyni Hastanesi'nde böbrek nakli yapılan alıcılar arasında rastgele seçilmiştir ve kan örnekleme ve laboratuvar deneyleri için numuneler izin belgesi imzalandıktan

sonra çalışmaya alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması $35,4 \pm 14,5$ yıl (altı ila 65 yaş) olan 61 erkek (%67) ve 30 kadın (%33) seçilmiştir. Elli dokuz hasta (%64,8) evli, 32 hasta (%35,2) bekar. On dokuz hasta (%20,9) eğitimsiz, 20 hasta (%22) ilkokula kadar, 10 hasta (%11) rehberlik okuluna, diğer on hasta (%11) liseye kadar eğitim görmüştür, 31 hasta (%34) diplomaya ve bir hasta (%1,1) akademik dereceye sahiptir. Çalışma hastaları arasında böbrek yetmezliği etiyolojisi 33 olguda (%36,2) glomerülonefrit, 28 olguda (%30,8) hipertansiyon (HTN), 12 olguda (%13,2) polikistik böbrek hastalığı, nefrolitiazis ve fokal ve segmental glomerüloskleroz (FSGS) olarak tespit edilmiştir. Her ikisinde de diabetes mellitus Alport sendromu, her birinde bir olguda nörojenik mesane ve idrar enfeksiyonu (1Sixty-5 hasta (%71,4) %HD) geçirdi. Renal transplantasyondan önce 26 hastanın (%28,6) böyle bir öyküsü yoktu. Sadece 37 hastada (%40,7) kan transfüzyonu öyküsü bulunmaktadır. Çalışma sırasındaki katılımcıların nakil sonrası ortalama süresi 5.47 ± 5.19 yıldır. Çalışmada yer alan hastalar arasında ortalama anti-Parvovirus B19 IgG titresi 58.2 ± 64.8 idi. 4'ten küçük IgG titresi negatif olarak kabul edildi, 4-55 sınır çizgisi aralığındaydı ve 5.5'ten fazla anti-Parvovirus B19 için pozitif olarak kabul edilmiştir. Böylece 63 hasta (%69,2) Parvovirus B19 için seropozitif, 22 hasta (%24,2) seronegatif ve altı hasta (%6,6) sınırdaki bölgede IgG titresine sahiptir. Analizi yapmak için, seronegatif olanları olan borderline vakaları dahil edilmiştir.

Bununla birlikte seronegatif grup 28 olgudan (%30,8) oluşuyordu. Seropozitif gruptaki ortalama anti-Parvovirus B19 IgG titresi 83.0 ± 63.7 ve seronegatif grupta 2.38 ± 1.51 ($P = 0.000$) dir [158].

İtalya'da 64 Böbrek nakli alıcısından rapor edilmiştir. Her ikisi de anemik olmayan hasta grubuna ait olan 2 tanesi (%3.12) aktif Parvovirus B19 enfeksiyonundan etkilenmiştir. Özellikle, PV B19 enfeksiyonu prevalansı anemik olmayan hastalarda %4 (2/50) iken, anemik hastalarda %0 (0/14) idi. Bu sonuç, muhtemelen küçük örneklem büyüklüğü nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı değildir (Fisher kesin testi $P = 0.6$). Anemik olmayan 50 böbrek nakli hastasında (%4) dır. Burada incelenen PV B19 için pozitif olan anemik olmayan hastaların, 1×10^5 genom kopyalarını / reaksiyonunu aşmayan viral yükler gösterdiği belirtilmelidir.

Sonuçlar, şaşırtıcı bir şekilde, sadece 1 x 10⁶ kopyadan daha yüksek viremik titreleri / reaksiyonu, ciddi anemi ile ilişkilendiren önceki bir çalışma ile tutarlıdır. Bu çalışmada; (0/14) şiddetli anemili böbrek nakli hastalarının Parvovirus B19 ile aktif bir enfeksiyonu bulunmaktadır, ancak bir B19 pozitif hasta hemoglobin konsantrasyonunda ve hematokritte orta derecede bir azalma göstermiştir. Ancak, posttransplant anemi tanımındaki heterojenlik nedeniyle farklı çalışmaların sonuçlarını karşılaştırmanın zor olduğunu vurgulamak gerekmektedir. Sonuç olarak, Parvovirus B19 enfeksiyonunun böbrek nakli popülasyonunda yaygın olmadığını ve ciddi anemi ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Transplantasyon sonrası anemi ve / veya ağır immünosüpresyon rejiminin tüm vakalarında Parvovirus B19 için rutin olarak ayırıcı bir tanı yapılması gerektiğini önermişlerdir [159].

Orta Doğu ülkesinde, böbrek nakli hastasında parvovirus B19'un saptanması için yayınlanmış çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Arap ülkelerinde Suudi Arabistan'da, 2013 yılında yapılan ve Doğu Suudi Arabistan'daki bir üçüncü hastanenin nefroloji kliniklerine düzenli olarak katılan 88 böbrek alıcısını kapsayan iki çalışma bulunmaktadır. Viral spesifik IgG ve IgM antikorları, virüs benzeri partikül bazlı bir ELISA kullanılarak ölçülmüştür. IgM-pozitif örnekler, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile viral DNA için test edilmiştir. Bu hasta grubunun yaş ortalaması 41'dir (dağılım 17-72) ve 45 erkek ve 43 kadın yer almıştır. B19'a karşı IgG antikorları hastaların çoğunda (66/88; %75) gösterilmiştir. IgM düşük frekans göstermiştir (18/88; %20,5). Parvovirüs B19 viremisinin tespiti için RT-PCR kullanılarak, tüm IgM-pozitif numunelerinin parvovirüs B19 viral DNA'sı için pozitif olduğu bulunmuştur. Nispeten daha fazla B19 seropozitifliğinin, mikofenolat mofetil (58'den 9; %15,5) almakla karşılaştırıldığında azatiyoprin (30'dan 8, %26,6) alınması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Parvovirus B19'un seropozitifliği ve viral DNA seviyeleri, incelenen renal transplant alıcı popülasyonunda nispeten yüksektir. Çalışma, B19 enfeksiyonunun böbrek nakli alıcılarında yaygın olduğu sonucuna varıldığını ve bir alıcıda iki veya daha fazla pozitif B19 IgM veya PCR olduğunda klinik enfeksiyondan şüphelenilmesi gerektiğini göstermiştir. Ek olarak, B19 enfeksiyonu, böbrek nakli sonrası düşük Hb seviyeleri ve PRCA ile önemli derecede ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, B19 enfeksiyonu ile greft fonksiyon bozukluğu arasında bir ilişki kanıtı

bulunmamaktadır. B19 PCR testinin, böbrek nakli alıcıları için pozitif IgM sonucunun doğrulanması olarak kullanılmasının gerekip gerekmediği sorusunun ele almak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır [160].

Irak'ta yapılan ikincisi Bağdat ve Al-Khayal Hastanesi Şehri'nde bulunan Böbrek Hastalıkları ve Nakil Merkezi'nden canlı donörden ilk veya ikinci böbrek nakli yapılan 38 erkek ve 12 kadından oluşan 50 böbrek nakli alıcısına dahil edilmiştir. Bu çalışmada viral yükün tespiti için art arda üç ay takip edilmiştir. Ağustos 2015 ile Şubat 2016 arasındaki dönemde kan örnekleri toplanmıştır. Çalışmaya katılmadan önce her hastadan izin alınmıştır. Serolojik yöntemler için venipunktür yoluyla üç mililitre kan elde edilmiştir. Bu üç mililitre örnek, jel tüpü ile iyice santrifüje edildi ve serum gecikmeden ayrılmıştır. Serumlar -20 ° C'de saklanmıştır ve enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA; DRG / Almanya) ile anti-Parvovirus B19 IgG ve IgM için test edilmiştir. Hb ve ortalama korpusküler hacim (MCV) seviyeleri, hücre sayacında ölçülmüştür. Bu çalışmada, sonuçlar, B19'un seropozitifliği ile sırasıyla IgG ve IgM için serum kreatinin ($P = 0.99, 0.364$) arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir. Ayrıca, insan B19 için IgG'nin sonuçları, nakil sonrası dönemde anlamlı bir farklılık göstermezken, insan Parvovirüs B19 için pozitif IgM, nakil sonrası ilk altı ay içinde enfeksiyon ile önemli farklılıklar gösterdi çünkü hastalar yüksek oranda immünosupresandır. IgG için yapılan bu çalışmanın sonuçları, RTR için anlamlı olmayan ilişki düşük Hb (anemi) düzeyini göstermiştir ($P = 0.77$).

B19 IgM, anemik grup çalışması açısından önemli farklılıklar göstermiştir. B19 seroprevalansının Irak'taki böbrek nakli alıcılarında nispeten yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. B19 enfeksiyonu insidansı, böbrek nakli popülasyonunda küçümsenebilmektedir. Hastalar rutin olarak bu virüs için test edilmemiştir çünkü tanı sıklıkla göz önünde bulundurulmaz ve teşhis testlerinin seçimi kafa karıştırıcı olabilmektedir. Kan filmi ve retikülosit sayımı en az iki ayda bir rutin bir tarama programı olarak önerilmelidir ve retikülositopenisi olanlara B19 viral yük ölçümü önerilmektedir. Bu çalışma, Irak nakil merkezlerinin böbrek vericilerinde ve alıcılarında -B19 enfeksiyonunun tespiti için serolojik testleri içermesini önermektedir [161].

Diğer taraftan, benzer bir çalışma 2009 yılında aynı alanda, Trablus Libya'daki gebe kadınlarda B19 IgM ve IgG prevalansını saptamak için yapılmıştır. 150 gebe kadında IgG (%61,3) ve IgM (%5,3) prevalansı saptanmıştır. B19'un Libyalı hamile kadınlarda yaygın olduğu sonucuna varılmıştır [162].



3. YÖNTEM

3.1. Çalışma Tasarımı

3.1.1. Etik Onay

Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden, Tripoli Merkez Hastane İdaresi-Tripoli ve General Hawari Hastanesi-Bingazi'den Etik kurul onayı alınmıştır. Böbrek nakli onayı, direkt görüşen kıdemli memur doktor tarafından yazılı anketi doldurmalarını istedikten ve seroloji sonuçlarının gözden geçirilmesi onaylanmadan önce alınmıştır.

3.1.2. Anket Geliştirme

Anketler, her böbrek nakli için Tripoli Merkez Hastanesi ve Genel Hawari Hastanesi'nde böbrek nakli bölümündeki kişisel veriler (isim, adres, yaş, uyruk) ve diğer veriler olmak üzere elde edilen verileri içermektedir (geçmiş yaş, anemi sitopeni) ve diğer virüs enfeksiyonu).

3.1.3. Çalışma Örnekleri

Çalışma, Tripoli tıp merkezinde yapılmıştır. Libya'da bulunan iki ana böbrek nakli merkezinde (Tripoli Merkez Hastanesi- General Hawari Hastanesi) kontrolleri yapılan 50 böbrek nakli hastasından ilki Mayıs 2017'den sonuncusu ise Mart 2018'e kadar olan periyotta 50 numune alınmıştır.

3.1.4. Çalışma Sitesi

Toplanan örnekler, araştırmacı tarafından yapılan test analizleri 15/5/2017 ile 22/3/2018 tarihleri arasında IgM ile B19 için IgG antikor tespiti Libya -Malta Hastanesi'nde 30 Ekim 2018 ile 29 Aralık 2018 tarihleri arasında Saint James Hastanesinde yapılmıştır. Olumlu sonuçlar analiz için Fransa'ya gönderilen RT-PCR ile doğrulanmıştır.

3.1.5. Kan Örnekleri Toplama ve Analiz

Toplanan kan numuneleri 5 ml'lik boş bir tüplerde toplandı ve pıhtılaşması için 15 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra serumu ayırmak için tüpler 3000 RPM'de 5 dakika santrifüjlendi. Ayrılan serumlar başka tüplere aktarıldı. Her tüp ankette yer alan BN hastasının ismine karşılık gelir ve Saint James Hastanesi'ne transfer edilene kadar -20 ° C'de dondurulmuş halde tutulur. Parvovirüs B19'a karşı insan serum IgG ve IgM antikorları, Alegria kompozisyonu kullanılarak indirekt ELISA prensiplerine ve RT-PCR ile teyit edilen pozitif sonuçlara bağlı olan enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) (ORG-Almanya) ile tespit edildi.

Numunelerden serumların ayrılmasından önce hemoglobin seviyesi CBC ekipmanı ile ölçüldü ve sonuçlar destek sorgulayıcıya kaydedildi.

3.2. B19'da ELISA testi

- Parvovirus IgG için Ticari ELISA Teşhis kitleri
- Parvovirus IgM için ELISA Diyagnostik Kitleri
- Tanı aracı: Alegria
- Otomatik karıştırıcı ve çalkalayıcı
- İnkübatör
- Santrifüj
- 10-1000µ doğru şekilde iletebilen çok kanallı mikropipetler (Otomatik)
- Taze distile veya deiyonize su

3.2.1. Kan Örnekleri

Alegria testinde, Alegria Test Strips adı verilen 8 kuyucuklu mikro strips bulunmaktadır. Her bir şerit bir hasta numunesi için ayrılmıştır. Alegria Test Strip tam bir reaktif setine sahiptir. Setin içinde enzim konjugatı, enzim substratı, numune tamponu ve teste özel bir kontrol bulunmaktadır. Ayrıca her bir şerit, bir kontrol ve bir hasta numunesi için reaksiyon kuyusu görevi gören iki antijen kaplı oyuğa sahiptir.

Testin sonuçları aşağıdaki adımlarla dolaylı bir enzime bağlı immün reaksiyona dayanmaktadır: Pozitif numunelerde bulunan antikorlar, antikor antijen kompleksi oluşturan iki reaksiyon kuyusunun yüzeyi üzerine kaplanan antijene bağlanmaktadır. İnkübasyondan sonra, birinci yıkama aşaması bağlanmamış ve spesifik olmayan bağlanmış molekülleri uzaklaştırır. Daha sonra eklenen enzim konjugatı, immobilize edilmiş antikor-antijen kompleksine bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış enzim konjugatı ikinci bir yıkama ile uzaklaştırılmaktadır. Enzim substrat çözeltisinin eklenmesi inkübasyon sırasında hidrolizasyon ve renk değişimi ile sonuçlandırır. Mavi rengin yoğunluğu antikor-antijen kompleksinin konsantrasyonu ile ilişkilendirilmektedir ve 650 nm'de fotometrik olarak ölçülebilmektedir.

Alegria Test Strip, tescilli SMC Teknolojisine (Sensotronic Memorized Calibration) dayanmaktadır. Her Alegria Test Strip'te basılan barkodda test, analiz ve değerlendirme hakkında bilgiler ve partiye özgü son kullanma tarihi yer almaktadır. Alegria Test Strip tamamen otomatik bir Rasgele Erişim Analizörü olan Alegria teşhis cihazı ile birlikte kullanılır. Barkodda kodlanan SMC Teknolojisi verileri Alegria Test Strip'ten cihaza aktarılır. Test otomatik olarak işlenir ve değerlendirilir. Enstrüman son kullanma tarihini okur ve Alegria Test Strip'in güncel olmaması durumunda daha fazla testi yapmaz.



Şekil 3.1. Tanı aracı: Alegria

3.2.2. Test Üreticisi

SMC teknolojisi ile donatılmış Alegria Test Stripleri, Alegria teşhis cihazı ile birlikte kullanılmaktadır.

Cihazın kullanımı hakkında ayrıntılı bilgi Cihaz Kullanım Kılavuzundan alınabilir.

(1) Alegria Test Strip'in 1-4 boş kuyucuklarından folyo çıkarılır. 5-8 kuyucuklarındaki basılı barkodlu folyo çıkarılmaz.

(2) 10 µl seyreltilmemiş numune kuyu 1'in dibine pipetlenir.

(3) Strip SysTray'e yerleştirilir.

(4) Yüklenen SysTrays Alegria cihazında doğru konuma yerleştirilir ve çalışma başlatılır. Diğer tüm adımlar otomatik olarak gerçekleşir. Test sonuçları, cihaz sonuçları yazdırmaya başladığında tamamlanır.

3.2.3. IgG Kitinin İçeriği

24 tespit için yeterli Alegria Test Stripleri her biri 8 oyuktan oluşan modüllerdir:

1- Kuyu 1 + 2: boş ve kaplanmamış (rnek dilüsyonu için kuyucuklar)

2- Kuyu 3 + 4: antijen ile kaplanmış (reaksiyon oyukları)

3- Kuyu 5: Kontrol; Sarı; teste özgü antikorlar, PBS, BSA, deterjan, koruyucu %0,09 sodyum azit ve %0,05 ProClin içerir.

4- Kuyu 6: Enzim Eşleniği; Açık kırmızı; anti-insan IgG antikorları içeren, etiketli HRP; PBS, BSA, deterjan, koruyucu %0,05 ProClin 300 içerir.

5- Kuyu 7: rnek Tampon: sarı; %0,09 PBS, BSA, deterjan, koruyucu sodyum azit ve %0,05 ProClin içerir.

6- Kuyu 8: TMB Substratı: berrak; 3,3',5,5-Tetrametilbenzidin içeren Rekombinant VP2'den oluşturulan yüksek oranda saflaştırılmış virüs benzeri parçacıklar reaksiyon oyuklarına bağlanır.

Barkoddaki rn kodu:

%0,09 oranında Tris, deterjan, koruyucu sodyum azit içeren Yıkama Tamponu; 50 x konsantrasyonda.

Asit içeren sistem Sıvısı; 1000 x konsantrasyonda.

3.2.4. IgM Kitinin İçeriği

24 tespit için yeterli Alegria Test Stripleri her biri 8 oyuktan oluşan modüllerdir:

1- Kuyu 1 + 2: boş ve kaplanmamış (rnek dilüsyonu için kuyucuklar)

2- Kuyu 3 + 4: antijen ile kaplanmış (reaksiyon oyukları)

3- Kuyu 5: Kontrol; Sarı; teste özgü antikorlar, PBS, BSA, deterjan, koruyucu %0,09 sodyum azit ve %0,05 ProClin içerir.

4- Kuyu 6: Enzim Eşleniği; Açık kırmızı; anti-insan IgM antikorları içeren, etiketli HPR; PBS, BSA, deterjan, koruyucu %0,05 ProClin 300 içerir.

5- Kuyu 7: Örnek Tampon: sarı; %0,09 PBS, BSA, deterjan, koruyucu sodyum azit ve %0,05 ProClin içerir.

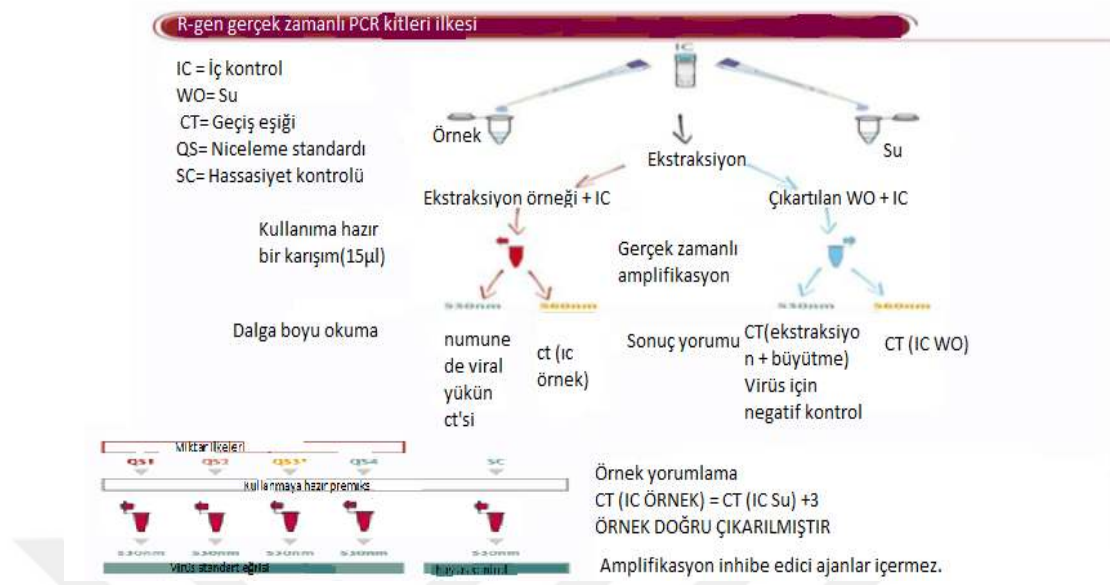
6- Kuyu 8: TMB Substratı: berrak; 3,3',5,5-Tetrametilbenzidin içeren Rekombinant VP2'den oluşturulan yüksek oranda saflaştırılmış virüs benzeri parçacıklar reaksiyon oyuklarına bağlanır.

3.3. Gerçek Zamanlı PCR- B19

3.3.1. Gerçek Zamanlı PCR Prensibi

Gerçek zamanlı PCR prensibi, florojenik 5'nükleaz analizine dayanır. PCR reaksiyonu sırasında, DNA polimeraz probu 5 'ucunda ayrılır ve sadece prob hedef DNA'yı hibritlediğinde raportör boya söndürücüden ayrılır. Bu ayrılma, PCR tespit sistemi tarafından gerçek zamanlı olarak izlenen, bölünmüş raportör boya tarafından üretilen floresan sinyaline yol açar.

Floresan sinyalinde bir artışın başlangıçta tespit edildiği PCR döngüsü (Ct), spesifik PCR ürününün miktarı ile orantılıdır. Gerçek Zamanlı sırasında floresan yoğunluklarının izlenmesi, amplifikasyondan sonra reaksiyon tüpünü tekrar açmak zorunda kalmadan biriken ürünün tespitine izin verir.



Şekil 3.2. RT-PCR ilkesi [104].

3.3.2. Ürün Açıklaması

İnsan parvovirüs B19 gerçek zamanlı PCR kiti, gerçek zamanlı PCR sistemindeki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile insan parvovirüs B19'un tespiti için kullanıma hazır bir sistem içerir. Master, insan parvovirus B19 DNA'sının spesifik amplifikasyonu için reaktifler ve enzimler içerir.

Floresan, PCR sırasında gerçek zamanlı sistemlerin optik birimi tarafından yayılır ve ölçülür. Amplifiye edilmiş B19 DNA parçasının tespiti, floresan söndürücü BHQ1 ile florimetre kanalı FAM içinde gerçekleştirilir. Kitte DNA ekstraksiyon tamponu bulunur ve DNA ekstraksiyonu için kan serum örnekleri kullanılır. Ek olarak, kit dahili kontrolün (IC) VIC / JOE floresansını ölçerek olası PCR inhibisyonunu tanımlamak için bir sistem içerir. Harici bir pozitif kontrol (1 x 10⁶ kopya / ml), gen yükünün belirlenmesini sağlar.

3.3.3. Gerekli Malzemeler ve Cihazlar

- Biyolojik dolap
- Gerçek zamanlı PCR sistemi

- “eppendorf” tipi tüpler için masaüstü mikrosantrifüj (RCF maks. 16.000 x g)
- Vortex Mikseri
- Gerçek zamanlı PCR reaksiyon tüpleri / plakaları
- Kriyo-konteyner
- Pipetler (0,5 mikrolitre – 1000 mikrolitre)
- Mikro pipetler için steril filtre uçları
- Steril mikro tüpler
- Tek kullanımlık eldivenler, pudrasız
- Biyolojik tehlike atık kabı
- Buzdolabı ve dondurucu
- Tüp rafları
- Numuneler, B19 kitleri veya geni ile ilgili olarak RT-PCR makinesi ile analiz edildi.

4. SONUÇLAR

Elli böbrek nakli alıcı örneği, Libya'da böbrek nakli merkezlerinde 12-66 yaş aralığındaki (12-66) BN arasından rastgele seçilip, Parvovirüs B19'un seropozitif olarak tespit edilmesi için CBC ekipmanı ve ELİSA analizine tabi tutulup anemi ve parvovirus B19 enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi bulabilir. Transtransplantasyon hastaları Libya'nın farklı bölgelerinden gelmektedir. Veri analizi bilgisayar yazılımı ile yapıldı (SPSS sürüm 23). Frekanslar, yüzdeler hesaplandı ve verilerdeki farklı değişkenler arasındaki anlamlı ilişkiyi incelemek için Chi Squire Analysis ile karşılaştırma yapıldı. İstatistiksel anlamlılık 0,05'in altındaki p değerinde alınmıştır. Bu çalışmada 33/50 (%66) böbrek nakli alıcısı parvovirüs B19'a ve 3/50 (%6) parvovirüs B19'a pozitif.

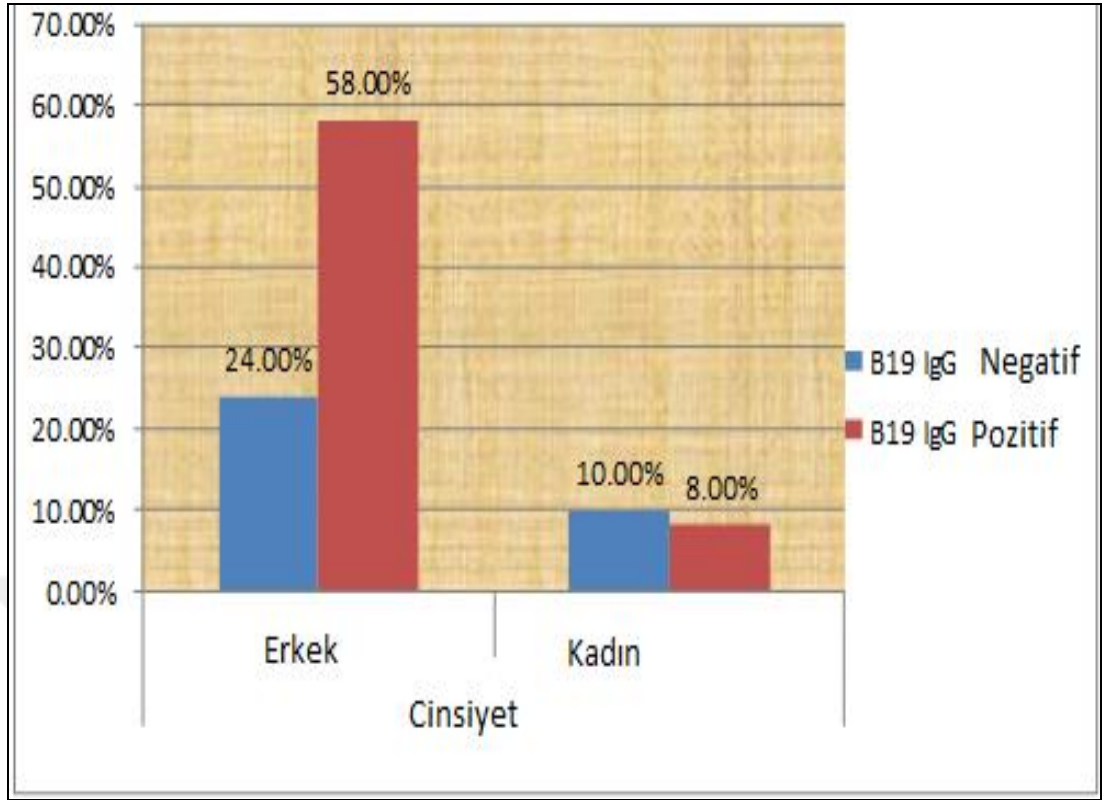
4.1. IgG Serolojik Sonuçları

50 BN arasında spesifik IgG antikorlarının varlığı açısından 33 (%66), 4/9 kadın (%44), 29/41 erkek (%70)'te pozitif bulundu (Tablo 4.1). En olumlu vakalar 38 yaşından büyük grupta ortaya çıkarmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

Prevalans ve cinsiyet gruplarının doğrulama tabloları					
			Cinsiyet		Toplam
			Erkek	Kadın	
B19 IgG	Negatif	Sayı	12	5	17
		% B19 IgG içerisinde	%70,6	%29,4	%100,0
		% Cinsiyet içerisinde	%29,3	%55,6	%34,0
		% Toplam	%24,0	%10,0	%34,0
	Pozitif	Sayı	29	4	33
		%B19 IgG içerisinde	%87,9	%12,1	%100,0
		% Cinsiyet içerisinde	%70,7	%44,4	%66,0
		% Toplam	%58,0	%8,0	%66,0
Toplam		Sayı	41	9	50
		% B19 IgG içerisinde	%82,0	%18,0	%100,0
		% Cinsiyet içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%82,0	%18,0	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ile), prevalans ve cinsiyet grupları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir, $\chi^2 (1, n = 50) = 1.252$, $p = .263$.

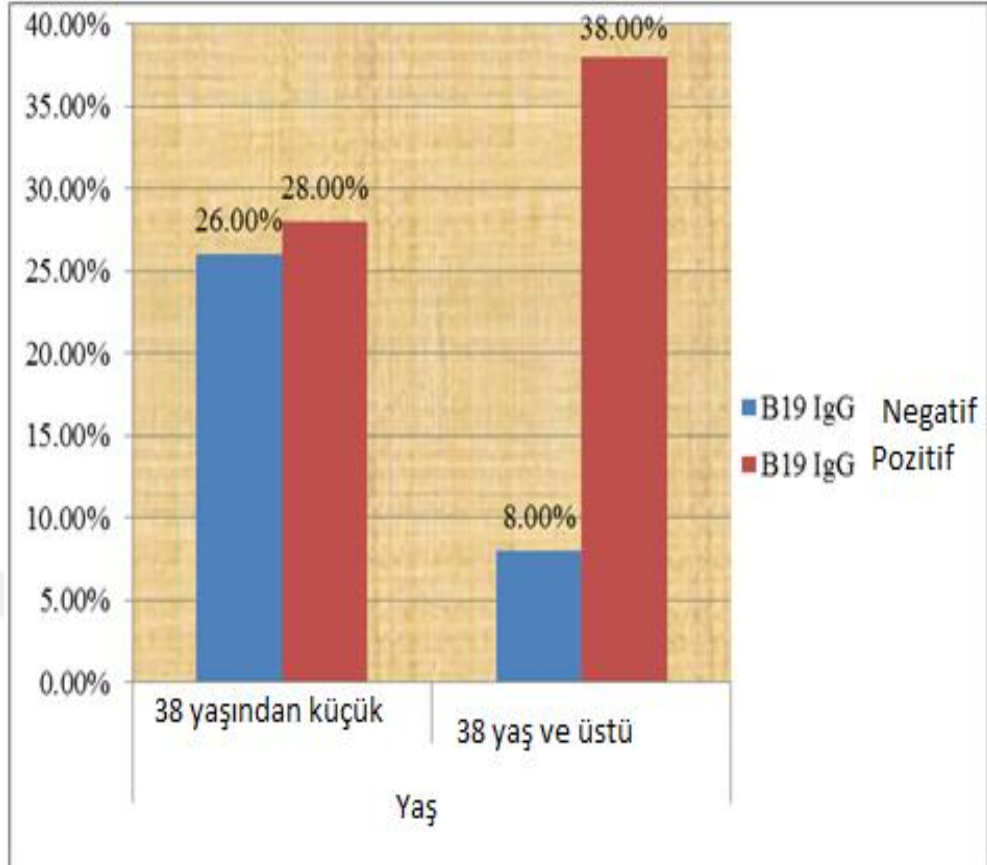


Grafik 4.1. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

Tablo 4.2. B19 IgG testine göre yaş gruplarında prevalans

Prevalans ve yaş gruplarının çapraz tablolanması					
			Yaş		Toplam
			38 yaşından küçük	38 yaş ve üstü	
B19 IgG	Negatif	Sayı	13	4	17
		% B19 IgG içerisinde	%76,5	%23,5	%100,0
		% Yaş içerisinde	%48,1	%17,4	%34,0
		% Toplam	%26,0	%8,0	%34,0
	Pozitif	Sayı	14	19	33
		% B19 IgG içerisinde	%42,4	%57,6	%100,0
		% Yaş içerisinde	%51,9	%82,6	%66,0
		% Toplam	%28,0	%38,0	%66,0
Toplam		Sayı	27	23	50
		% B19 IgG içerisinde	%54,0	%46,0	%100,0
		% Yaş içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%54,0	%46,0	%100,0

Bağımsızlık için ki-kare testi, prevalans ve yaş grupları arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir, $\chi^2 (2, n = 50) = 5.236, p = .022$.

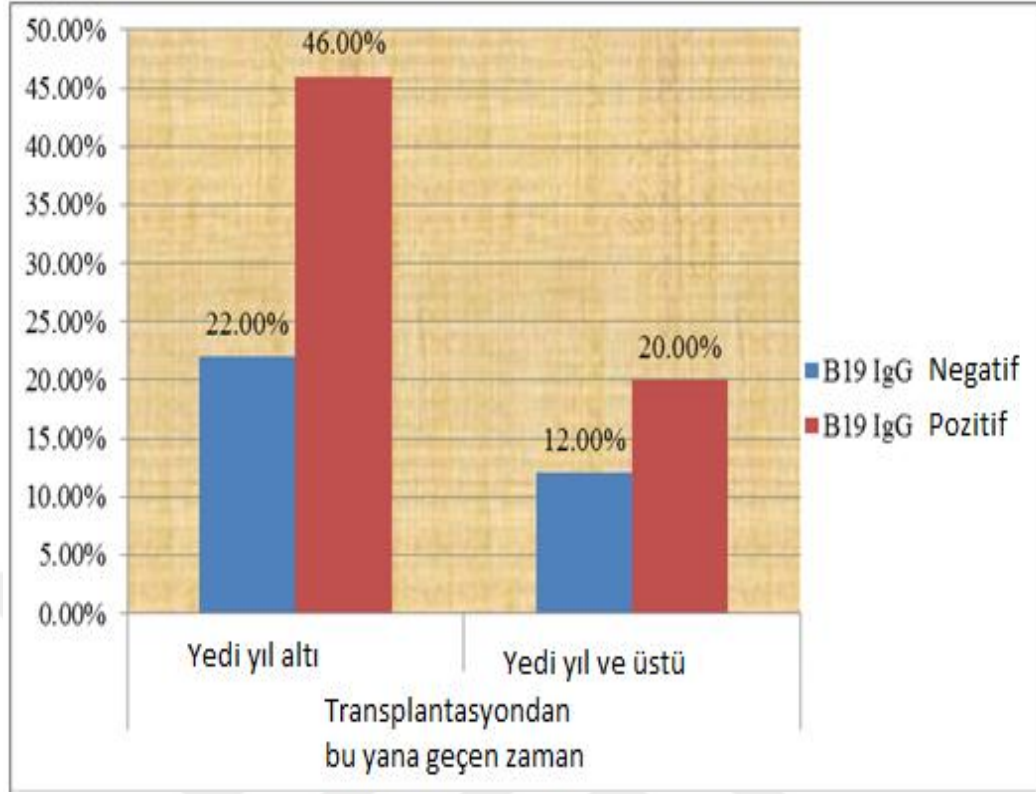


Grafik 4.2. (B19 IgG) testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

Tablo 4.3. B19 IgG testine göre transplantasyondan bu yana geçen Prevalans ve Zaman

Transplantasyondan bu yana Prevalans ve Zaman çapraz tablosu					
			Transtransplantasyondan bu yana geçen zaman		Toplam
			Yedi yıl altı	Yedi yıl ve üstü	
B19 IgG	Negatif	Sayı	11	6	17
		% B19 IgG içerisinde	%64,7	%35,3	%100,0
		% Transplantasyondan bu yana geçen zaman içerisinde	%32,4	%57,5	%34,0
		% Toplam	%22,0	%12,0	%34,0
	Pozitif	Sayı	23	10	33
		% B19 IgG içerisinde	%69,7	%30,3	%100,0
		% Transplantasyondan bu yana geçen zaman içerisinde	%67,6	%62,5	%66,0
		% Toplam	%46,0	%20,0	%66,0
Toplam		Sayı	34	16	50
		% B19 IgG içerisinde	%68,0	%32,0	%100,0
		% Transplantasyondan bu yana geçen zaman içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%68,0	%32,0	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ile), transplantasyondan bu yana geçen prevalans ve zaman arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir, $\chi^2(1, n = 50) = .128, p = .720$.



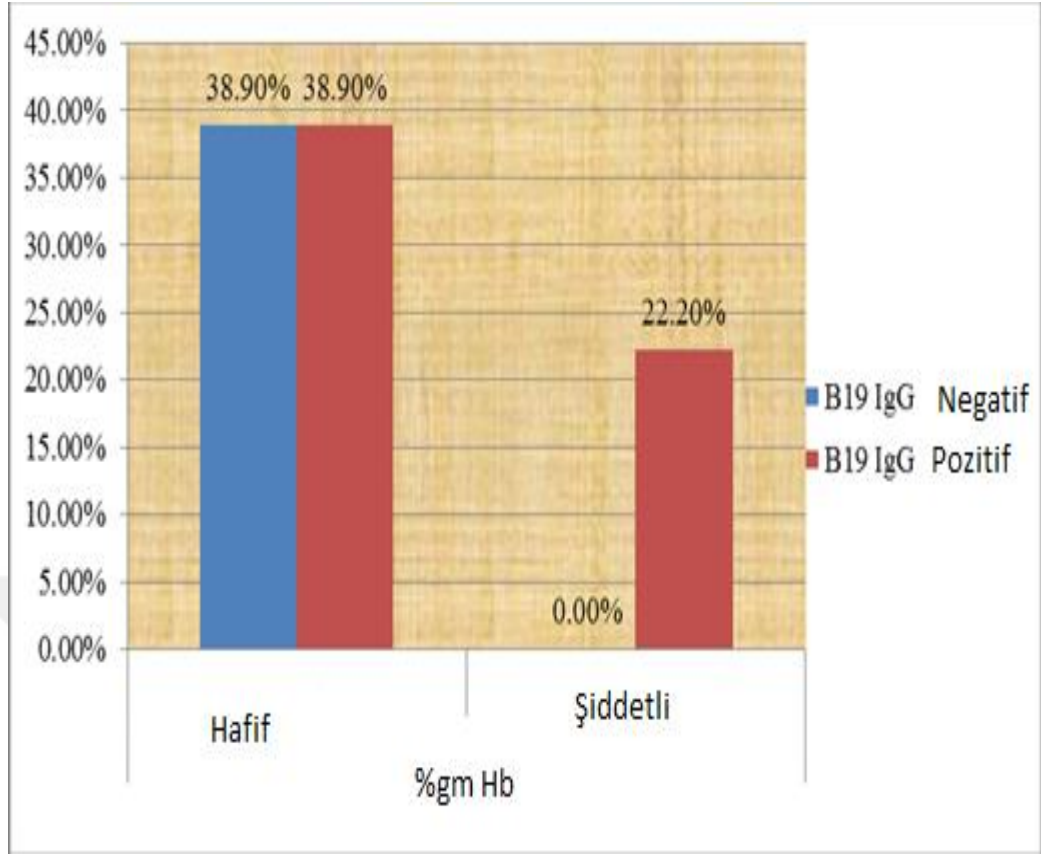
Grafik 4.3. B19 IgG testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

B19 IgG'ye pozitif olan 11 BN hastasının kansızlığı 11/33 (%36,6), yedisi hafif ve dördü ağır olduğu görülmektedir (WHO anemi sınıflamasına göre 11 yaşından küçük ve 9 yaşından küçük diye ayrılmıştır) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Prevalans ve % Hb gm(B19 IgG) testine göre

Prevalansın çapraz tablolanması ve % Hb gm					
			%Hb gm		Toplam
			Hafif	Şiddetli	
B19 IgG	Negatif	Sayı	7	0	7
		%B19 IgG içerisinde	%100,0	%0,0	%100,0
		%Hb gm içerisinde	%50,0	%0,0	%38,9
		% Toplam	%38,9	%0,0	%38,9
	Pozitif	Sayı	7	4	11
		%B19 IgG içerisinde	%63,6	%36,4	%100,0
		%Hb gm içerisinde	%50,0	%100,0	%61,1
		% Toplam	%38,9	%22,2	%61,1
Toplam		Sayı	14	4	18
		%B19 IgG içerisinde	%77,8	%22,2	%100,0
		%Hb gm içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%77,8	%22,2	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ve Fisher's Exact Test ile), prevalans ve Hb gm%, $\chi^2 (1, n = 18) = 1.507$, $p = .119$ arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir.



Grafik 4.4. Prevalans ve % Hb gm(B19 IgG) testine göre

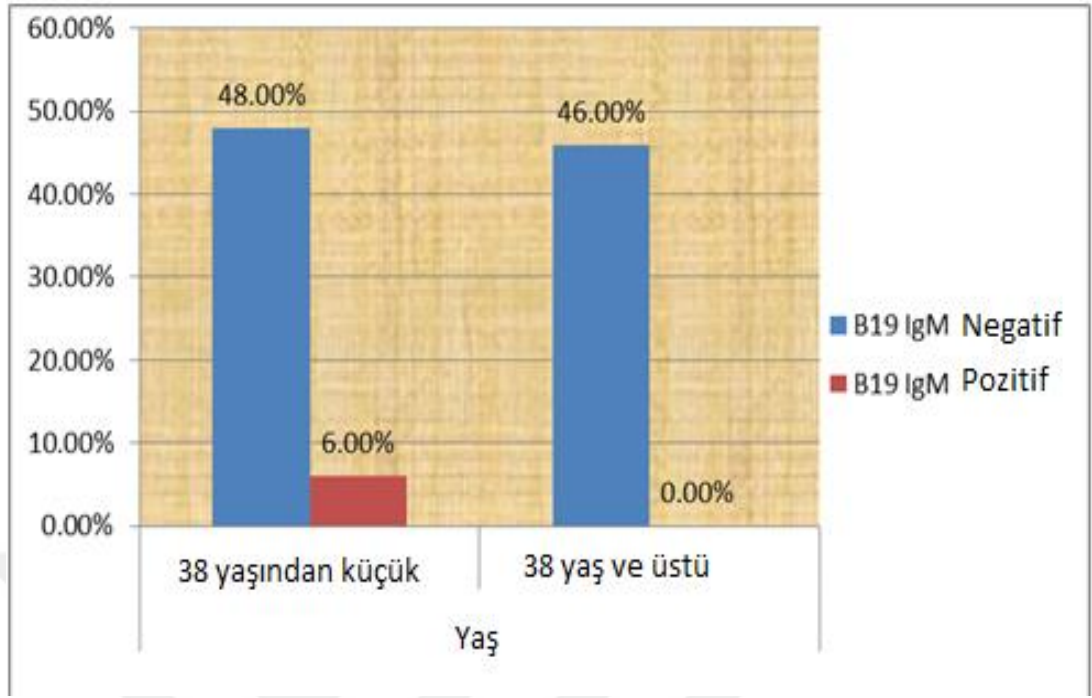
4.2. IgM Serolojik Sonuçları

B19 IgM antikorunun 50 BN sırasındaki prevalansı 3/50 (%6) idi. Tüm pozitif vakalar 38 yaşından küçük yaş grubunda meydana geldi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. B19 IgM testine göre yaş gruplarında prevalans

Prevalans ve yaş gruplarının çapraz tablolanması					
			Yaş		Toplam
			38 yaşından küçük	38 yaş ve üstü	
B19 IgM	Negatif	Sayı	24	23	47
		%B19 IgM içerisinde	%51,1	%48,9	%100,0
		% Yaş içerisinde	%88,9	%100,0	%94,0
		% Toplam	%48,0	%46,0	%94,0
	Pozitif	Sayı	3	0	3
		%B19 IgM içerisinde	%100,0	%0,0	%100,0
		% Yaş içerisinde	%11,1	%0,0	%6,0
		% Toplam	%6,0	%0,0	%6,0
Toplam		Sayı	27	23	%50
		%B19 IgM içerisinde	%54,0	%46,0	%100,0
		% Yaş içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%54,0	%46,0	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ve Fisher's Exact Test ile), prevalans ve yaş grupları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir, $\chi^2(2, n = 50) = 1.106, p = .240$.



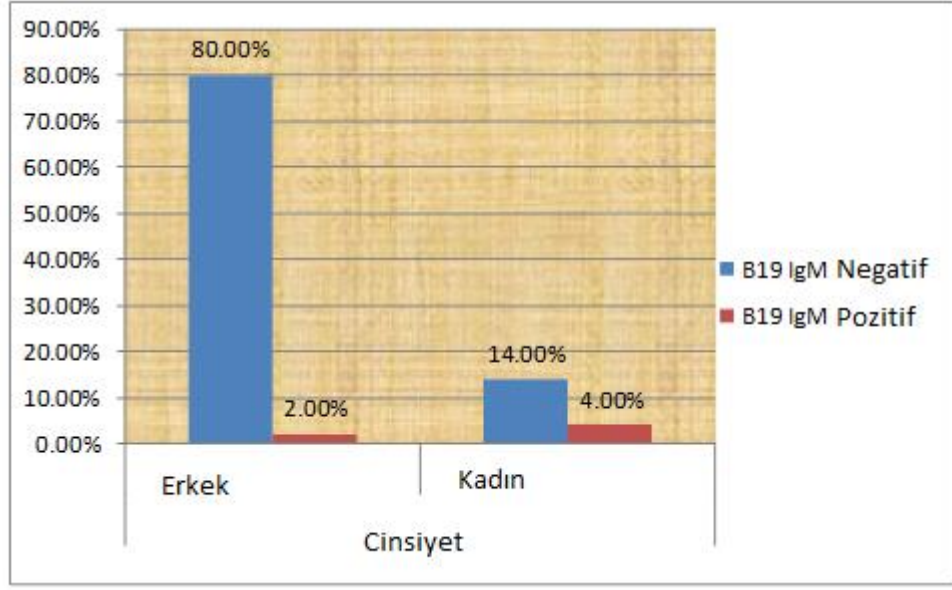
Grafik 4.5. B19 IgM testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

Pozitif vakalardan ikisi yetişkin kadın, biri erkekti (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. B19 IgM testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

Prevalans ve cinsiyet gruplarının çapraz tablolaması					
			Cinsiyet		Toplam
			Erkek	Kadın	
B19 IgM	Negatif	Sayı	40	7	47
		%B19 IgM içerisinde	%85,1	%14,9	%100,0
		%Cinsiyet içerisinde	%97,6	%77,8	%94,0
		% Toplam	%80,0	%14,0	%94,0
	Pozitif	Sayı	1	2	3
		%B19 IgM içerisinde	%33,3	%66,7	%100,0
		%Cinsiyet içerisinde	%2,4	%22,2	%6,0
		% Toplam	%2,0	%4,0	%6,0
Toplam		Sayı	41	9	50
		%B19 IgM içerisinde	%82,0	%18,0	%100,0
		%Cinsiyet içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		% Toplam	%82,0	%18,0	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ve Fisher's Exact Test ile), prevalans ve cinsiyet grupları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir, $\chi^2 (1, n = 50) = , p = .080$.



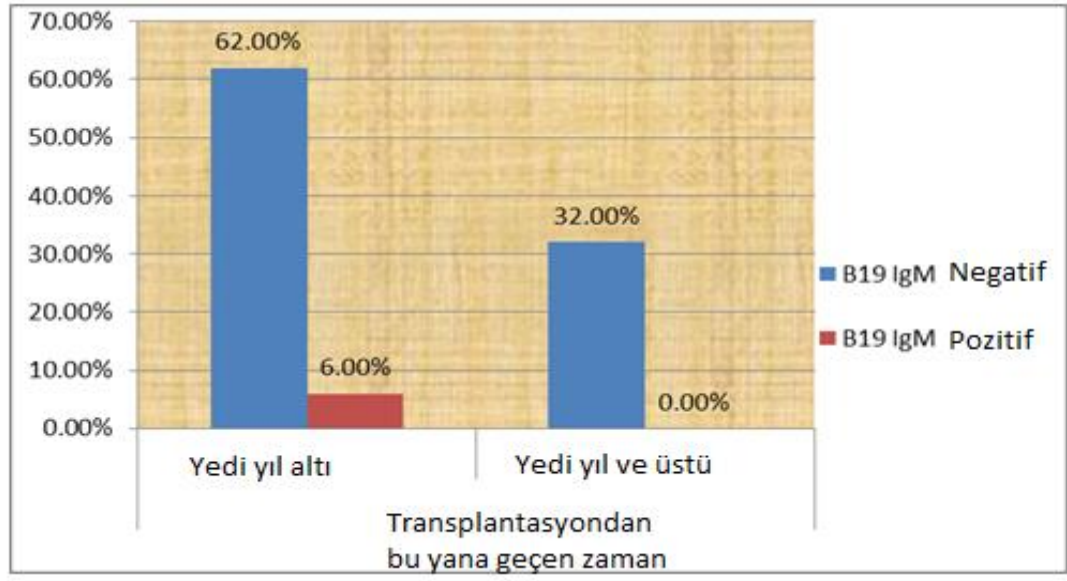
Grafik 4.6. (B19 IgM) testine göre cinsiyet gruplarında prevalans

B19 IgM pozitifliğinin tümü, yedi yıldan daha az bir sürede BN'de gösterdi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. B19 IgM testine göre transplantasyondan bu yana geçen Prevalans ve Zaman

Transplantasyondan bu yana Prevalans ve Zaman çapraz tablosu					
			Transplantasyondan bu yana geçen zaman		Toplam
			7 yıl altı	7 yıl ve üstü	
B19 IgM	Negatif	Sayı	31	16	47
		%B19 IgM içerisinde	%66,0	%34,0	%100,0
		%transplantasyondan bu yana geçen zaman içinde	%91,2	%100,0	%94,0
		%Toplam	%62,0	%32,0	%94,0
	Pozitif	Sayı	3	0	3
		%B19 IgM içerisinde	%100,0	%0,0	%100,0
		%transplantasyondan bu yana geçen zaman içinde	%8,8	%0,0	%6,0
		%Toplam	%6,0	%0,0	%6,0
Toplam		Sayı	34	16	50
		%B19 IgM içerisinde	%68,0	%32,0	%100,0
		%transplantasyondan bu yana geçen zaman içinde	%100,0	%100,0	%100,0
		%Toplam	%68,0	%32,0	%100,0

Bağımsızlık için Ki-kare testi (Yates Continuity Correction ve Fisher's Exact Test ile), prevalans ile transplantasyondan bu yana geçen zaman arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir, $\chi^2 (1, n = 50) = .345, p = .542$.



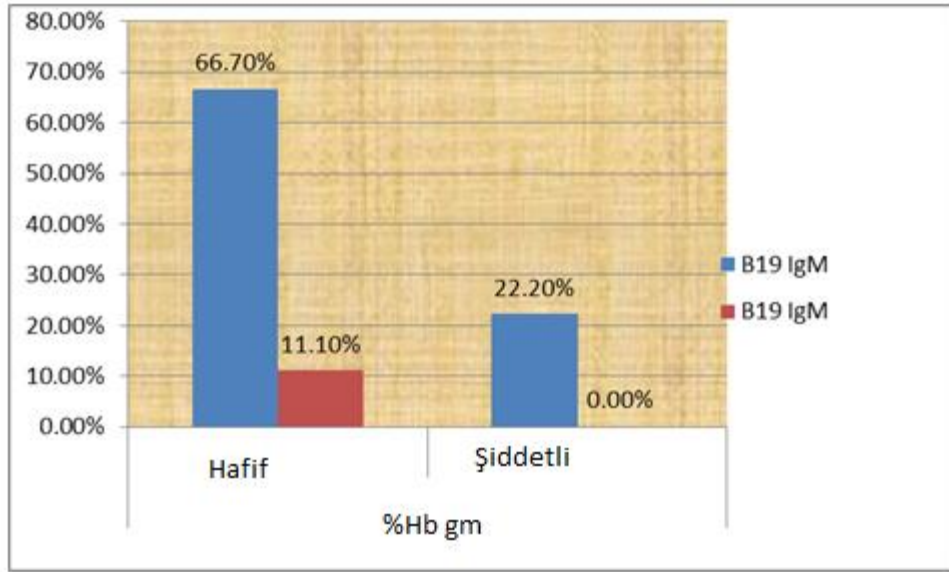
Grafik 4.7. B19 IgM testine göre plantasyondan bu yana geçen prevalans ve zaman

Son enfeksiyon nedeniyle, üç BN vakasında şiddetli anemi yoktur, sadece ikisinde hafif anemi vardır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Prevalans ve %Hb gm (B19 IgM) testine göre

Prevalansın ve % Hb gm'nin çapraz tablolanması					
			%Hb gm		Toplam
			Hafif	Şiddetli	
B19 IgM	Negatif	Sayı	12	4	16
		%B19 IgM içerisinde	%75,0	%25,0	%100,0
		%Hb gm içerisinde	%85,7	%100,0	%88,9
		%Toplam	%66,7	%22,2	%88,9
	Pozitif	Sayı	2	0	2
		%B19 IgM içerisinde	%100,0	%0,0	%100,0
%Hb gm içerisinde		%14,3	%0,0	%11,1	
%Toplam		%11,1	%0,0	%11,1	
Toplam		Sayı	14	4	18
		%B19 IgM içerisinde	%77,8	%22,2	%100,0
		%Hb gm içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0
		%Toplam	%77,8	%22,2	%100,0

Prevalans ve Hb gm%, χ^2 (1, n = 18) = .000, p = 1.000 arasında anlamlı bir ilişki olmadığını gösterdi.

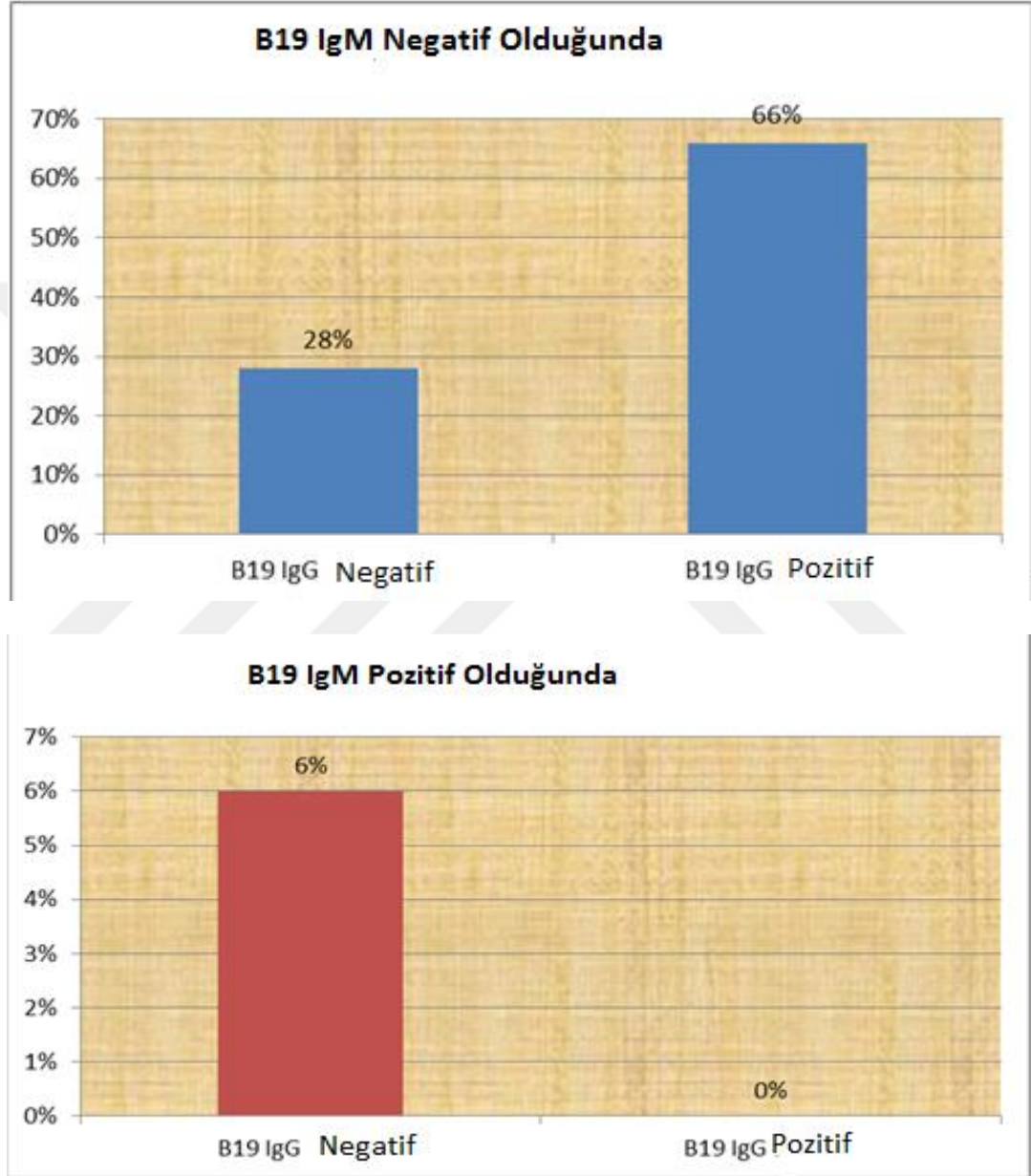


Grafik 4.8. Prevalans ve % Hb gm(B19 IgM) testine göre

Tablo 4.9. B19 IgM ve B19 IgG'ye göre virüs ile pozitif teşhis edilen örnek oranında bir değişiklik var mı?

B19 IgM ve B19 IgG sonuçlarının çapraz tablolaşması					
			B19 IgM		Toplam
			Negatif	Pozitif	
B19 IgG	Negatif	Sayı	14	3	17
		%B19 IgG içerisinde	%82,4	%17,6	%100,0
		%B19 IgM içerisinde	%29,8	%100,0	%34,0
	Pozitif	Sayı	33	0	33
		%B19 IgG içerisinde	%100,0	%0,0	%100,0
		%B19 IgM içerisinde	%70,2	%0,0	%66,0
Total		Sayı	47	3	50
		%B19 IgG içerisinde	%94,0	%6,0	%100,0
		%B19 IgM içerisinde	%100,0	%100,0	%100,0

McNemar'ın Testi, her iki testte de pozitif sonuç alan katılımcı oranındaki değişimin önemini test etmek için kullanılmıştır. Sonuçlar, B19 IgM ve B19 IgG karşılaştırıldığında, pozitif tanılı katılımcıların oranında anlamlı bir değişiklik olduğunu göstermiştir, ($p < 0.01$).



Grafik 4.9. B19 IgM ve B19 IgG'ye göre virüs ile pozitif teşhis edilen örnek oranında bir değişiklik var mı?

4.3. RT-PCR Sonuçları

ELISA testi bittikten sonra sonuçları RT-PCR ile doğrulamaya başlandı, IgM pozitifinin tümü (3 örnek) ile rastgele seçilmiş 20 örnek IgG'le test yapıldı. DNA tekniği ile yapılan numune onaylandığında, B19 IgM'ye pozitif olanların hepsinde DNA B19 ve 6/20'nin, IgG B19'a pozitif olan numunelerde, küçük numuneden dolayı herhangi bir statik analiz yapılamadığı için DNA B19'a sahip olduğu gösterildi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *RT-PCR sonuçları*

Test	Pozitif örnek sayısı	RT-PCR pozitif
IgM pozitif	3	3
Ig G pozitif	20	6

5. TARTIŞMA

Parvovirüs ile enfeksiyon dünya çapında yaygındır. Her iki cinsi ve her yaştan farklı yüzdeleri etkiler. 5 yaş altı çocukların %2-15'i; 5-19 yaşları arasındakilerin %15-60'ı, tüm yetişkinlerin %60'ı kadarı ve yaşlıların %90'ından fazlası seropozitifdir [4]. Çocuk doğurma çağındaki kadınların yaklaşık %35-45'i B19'a karşı koruyucu IgG antikorlarına sahip değildir. Gebelikte akut B19 enfeksiyonu insidansı endemik dönemlerde yaklaşık %1-2'dir. Ancak epidemik dönemlerde, enfeksiyon oranı %10'a yükselebilir [5]. İmmün baskılanmış hastalarda B19 enfeksiyonunun en sık görülen belirtileri anemi ve diğer sitopenidir. Bu nedenle, açıklanamayan anemi ve retikülositopeni veya pansitopenisi bulunan nakil alıcılarında bu tanı göz önünde bulundurulmalıdır. Anemi, böbrek nakli sonrası sık görülen bir sorundur ve alıcıların %40'ından fazlasını etkiler [6,7].

Libya'da ve Kuzey Afrika'daki diğer ülkelerde IgG Parvovirus B19'un böbrek naklindeki prevalansı daha önce tarif edilmemiştir. Ancak Irak gibi diğer ülkelerde (%18) Suudi Arabistan (%75), İran (%69,2) ve Libya'da 2009 yılında B19 tespiti yapıldı ve gebe kadınlarda IgG prevalansı (%61,3) olarak saptandı [156,160,161,162]. Çalışmamızda IgM prevalansı %6 idi. Yüksek immün baskılayıcıya bağlı olarak nakil sonrası ilk yıllarda meydana gelen 50 vakadan 3'ünde pozitif bulundu. Aynı bölgede 2009 yılında yapılan bir araştırmaya göre oran biraz daha yüksekti (%5,3), Libya'da BN'de IgM ve IgG'nin görülme sıklığı global B19 prevalans oranları Irak'taki (%10), Suudi Arabistan'da (%20,5) idi.

ELISA testlerinin sonuçlarını onaylamak için PT-PCR kullanımı yaygın değildir. Libya'da yayınlanmış az sayıda çalışma rapor edilmiştir. Bazı devlet araştırma merkezleri ve özel hastaneler, pahalı olduğu kadar sınırlı olduğu için RT-PCR tekniği yaygın olarak temin edilememektedir. B19 seroprevalansı hakkında gerçek bilgiler bulmak için çalışmamızı viral DNA tespitinde çok hassas olan ELISA tekniği ile birleştirmeye çalışıp, B19 IgM'nin tüm IgM B19 seropozitif örneklerinin B19 viral DNA 3/50 için pozitif olduğu saptanmıştır (%6). Suudi Arabistan 18/88'de yapılan benzer bir çalışmada (%20,5) ise IgG B19 onaylanmadı [160].

Bazı B19 enfeksiyonu vakaları kendiliğinden iyileşir ve böylelikle DNA virüsü PT-PCR ile IgG ELISA pozitif sonuçlarının doğrulanması sırasında serumda görünmezken, B19'a verilen antikor ELISA ve RT-PCR 20 örnekleri arasındaki farklı sonuçları açıklayan kan akışında kalır. Bunlardan 6'sında viral B19 DNA vardır.

Özellikle BN alıcıları, donörden, topluluktan veya endojen latent, kalıcı virüsün reaktivasyonundan semptomatik B19 enfeksiyonu alabilirler. Böbrek nakli hastalarında çok sayıda B19 enfeksiyon vakası bildirilmiş olmasına rağmen, B19 enfeksiyonunun klinik yükü iyi karakterize edilmemiştir. Dahası, BN alıcılarında B19 enfeksiyonu ile anemi arasındaki ilişki tam değildir. Irak'da yapılan çalışmada pozitif B19'un %26'sında anemi olsa da çalışmamızda anemi ve B19 enfeksiyonu arasındaki ilişki bulunmadı. Düşük Hb ve IgG seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken, B19 IgM diğer tarafta anlamlı bulundu. İran'daki diğer çalışma da aneminin ciddiyeti ile B19'un seropozitivitesi arasında bir ilişki bulunamadı. 59 BN arasında B19 PCR'nin hiçbiri pozitif değildi. 110 BN arasında da sadece iki tane pozitif B19 PCR vardır [161].

B19 virüsünün klinik bulgulara dayanması ve akut enfeksiyona yönelik laboratuvar incelemesinde ELISA kullanabilir. Ancak B19 tespit edilirse, enfeksiyon ve bağışıklık konusunda emin olmak için PCR gibi hassas bir tekniğe ihtiyaç duyulur.

6. SONUÇLAR

Çalışma örnekleri arasında B19'a önceden maruz kalma saptanmış ve test edilen 50 Libya BN'nin otuz üçü (%66) spesifik IgG için seropozitif bulunmuştur. Maternal (IgM) enfeksiyon oranı sekiz vakaydı (%6). Libya BN'nin %28'i B19'un neden olduğu enfeksiyona karşı hassastır (antikorları yoktur). Çalışmadaki çoğu BN 20-19 yaş arası B19 IgG ve IgM için pozitif; B19 IgG ve IgM seropozitivitesinin tümü, IgM'ye karşı pozitif olan BN'nin tamamı, B19 RT-PCR'ye karşı pozitif ve yirmi IgG'den altı numune, B19 RT-PCR'ye pozitif. Çalışmamızda anemi ile B19 enfeksiyonu arasında bir ilişki bulunmadı. Çalışmamızda Libya'da B19'un seroprevalansının BN'de yaygın olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B. & Widdows, D., (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1(7898),72.
- [2] Hemauer, A., Gigler, A., Garea, R., Reichle, A., Modrow, H. & Modrow, S., (1999). Infection of aphesis by parvovirus B19, *jurnal of general virology*,80, 627-630.
- [3] Cororan, A. & Doyle. S., (2004). Advances in the biology diagnosis and host pathogen interaction of parvovirus B19, *J. Med Microbiol*, 53, 459-475.
- [4] Young, N. S. & Brown, K. E., (2004). Mechanisms of disease: Parvovirus B19, *New England Journal of Medicine*, 350(6), 586–597.
- [5] Renoult, E., Bachelet, C., Krier-Coudert, M. J., Diarrassouba, A., André, J. L. & Kessler, M., (2006). Recurrent anemia in kidney transplant recipients with parvovirus B19 infection, *Transplantation Proceedings*, 38, 2321–2323.
- [6] Egbuna, O., Zand, M. S., Arbini, A., Menegus, M. & Taylor, J., (2006). A cluster of parvovirus B19 infections in renal transplant recipients: a prospective case series and review of the literature, *American Journal of Transplantation*, 6(1), 225–231.
- [7] Heegaard, E. & Brown, K., (2002). Human Parvovirus B19, *Clin Microbiol Rev*, 15, 485–505.
- [8] Summers, J., Jones, S. & Anderson, M., (1983). Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus, *J. Gen Virol*, 64, 2527–2532.
- [9] Pattison, J., Jones, S., Hodgson, J., Davis, L., White, J., Stroud, C. & Murtaza, L., (1981). Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anemia, *Lancet*, 1(82221), 664–665.
- [10] Anderson, M., Jones, S., Fisher-Hoch, S., Lewis, E., Hall, S., Bartlett, C., Cohen, B., Mortimer, P. & Pereira, M., (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease), *Lancet*, 321(8338), 1378.
- [11] Brown, T., Anand, A., Ritchie, L., Clewly, J. & Reid, T., (1984). Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis, *Lancet*, 2, 1033–1034.

- [12] Reid, D., Reid, T., Brown, T., Rennie, J. & Eastmond, C., (1985). Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description, *Lancet*, 325(8426), 422–425.
- [13] Cororan, A. & Doyle, S., (2004). Advances in the biology diagnosis and host pathogen interaction of parvovirus B19, *J. Med. Microbiol*, 53, 459-475.
- [14] Finkel, T. H., Torok, T. J., Ferguson, P. J., Durigon, E. L., Zaki, S. R. & Lueng, D. Y., (1994). Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotizing vasculitis: opportunistic infection or etiologic agent?, *Lancet*, 343(8908), 1255-8.
- [15] Kaufman, B., Simpson, A. & Rossmann, M., (2004). The structure of human parvovirus B19, *P Natl Acad Sci USA*, 101, 11628–11633.
- [16] Bönsch, C., Kempf, C. & Ros, C., (2008). Interaction of Parvovirus B19 with human erythrocytes alters virus structure and cell membrane integrity, *J. Virol*, 82, 11784–11791.
- [17] Hemauer, A., Von Pöblitzki, A., Gigler, A., Cassinotti, P., Siegl, G., Wolf, H. & Modrow, S., (1996). Sequence variability among different parvovirus B19 isolates, *J. Gen. Virol*, 77, 1781–1785.
- [18] Sol, N., Junter, J., Vassias, I., Freyssiner, J., Thomas, A., Prigent, A., Rudkin, B., Fichelson, S. & Orinet, F., (1999). Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor- α pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19, *J. Virol*, 73, 8762–8770.
- [19] Zhi, N., Mills, I., Lu, J., Wong, S., Filippone, C. & Brown, K., (2006). Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity, *J. Virol*, 80, 5941–5950.
- [20] Morita, E., Tada, K., Chisaka, H., Asao, H., Sato, H., Yaegashi, N. & Sugamura, K., (2001). Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G2 phase with accumulation of mitotic cyclin, *J. Virol*, 75, 7555–7563.
- [21] Mori, J., Beattie, P., Melton, D. W., Cohen, B. & Clewly, J., (1987). Structure and mapping of the DNA of human parvovirus B19, *J Gen Virol*, 68, 2797–2806.
- [22] Deiss, V., Tratschin, J., Weitz, M. & Siegl, G., (1990). Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini, *Virology* 175, 247–254.

- [23] Ozawa, K., Kurtzman, G. & Young, N., (1986). Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures, *Science*, 233, 883–886.
- [24] Chen, A. Y. & Qiu, J., (2010). Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest, *Future Virol*, 5, 731–743.
- [25] Servant, A., Laperche, S., Lallemand, F., Marinho, V., De Saint Maur, G., Meritet, J. & Garbag-Chenon, A., (2002) Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three enotypes, *J. Virol*, 76, 9124–9134.
- [26] Toan, N. L., Duechting, A. & Kremsner, P. G., (2006). Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients, *J. Gen. Virol*, 87(Pt 10), 2941-9.
- [27] Freitas, R. B., Melo, F. L., Oliveira, D. S., Romano, C. M., Freitas, M. R., Maceˆdo, O., Linhares, A. C., de A., Zanotto, P. M. & Durigon, E. L., (2008). Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil, *J. Clin. Virol*, 43, 60–65.
- [28] Grabarczyk, P., Kalinska, A., Kara, M., Wieczorek, R., Ejduk, A., Sulkowska, E., Gołebiewska-Staroszczyk, S., Matysiak, M., Baylis, S. & Brojer, E., (2011). Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland, *J. Med. Virol*, 83, 142–149.
- [29] Parsyan, A., Szmaragd, C., Allain, J. P. & Candotti, D., (2007). Identification and genetic diversity of two human parvovirus genotype 3 subtypes, *J. Gen Virol*, 88, 428–431.
- [30] Jones, M. S., Kapoor, A., Lukashov, V. V., Simmonds, P., Hecht, F. & Delwart, E., (2005). New DNA viruses identified in patients with acute infection syndrome, *J. Virol*, 79, 8230–8236.
- [31] Simmonds, P., Douglas, J., Bestetti, G., Longhi, E., Antinori, S., Paravicini, C. & Corbellino, M., (2008). A third genotype of the human parvovirus PARV4 in sub-Saharan Africa, *J. Gen. Virol*, 89, 2299–2302.
- [32] Wan, C., Soderlund-Venermo, M., Pintel, D. & Riley, K., (2002). Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses, *J. Gen. Virol*, 83, 2075–2083.
- [33] St Amand, J., Beard, C., Humphries, K. & Astell, C., (1991). Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs, *Virology*, 183, 133–142.

- [34] Weigel-Kelley, K., Yoder, M. & Srivastava, A., (2003). Alpha-5 beta-1 integrin as a cellular co-receptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry, *Blood*, 102, 3927–3933.
- [35] Simeoni, S., Puccetti, A., Tinazzi, E. & Lunardi, C., (2010). Parvovirus B19, *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*, 831–834.
- [36] Bönsch, C., Kempf, C., Mueller, I., Manning, L., Laman, N., Davis, T. & Ros, C., (2010). Chloroquine and its derivatives exacerbate B19V associated anemia by promoting viral replication, *PLoS Negl Trop Dis* 4, 699.
- [37] Ros, C., (2010). Chloroquine and its derivatives exacerbate B19V associated anemia by promoting viral replication, *PLoS Negl Trop Dis*, 4, 699.
- [38] White, D. & Fenner, F., (1994). Parvoviridae, *Medical Virology*- 4th edition, 285–293.
- [39] Guan, W., Cheng, F., Yoko, Y., Kleiboeker, S., Wong, S., Zhi, S., Pintel, D. J. & Qiu, J., (2008). Block to the production of full length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome, *J. Virol*, 82, 9951–9963.
- [40] Pallier, C., Greco, A., Le Junter, J., Saib, A., Vassais, I. & Morinet, F., (1997). The 30 untranslated region of B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells, *J. Virol*, 71, 9482–9489.
- [41] Cassinotti, P. & Siegl, G., (2000). Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual, *Eur. J. Clin. Microbiol*, 19, 886–887.
- [42] Lefrere, J., Servant-Delmas, A., Candotti, D., Mariotti, M., Thomas, I., Brossard, Y., Lefrere, F., Girot, R., Allain, J. P. & Laperche, S., (2005). Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety, *Blood*, 106, 2890–2895.
- [43] Azzi, A., Morfini, M. & Mannucci, P. M., (1999). The transfusion associated transmission of parvovirus B19, *Transfus Med Rev*, 13, 194–204.
- [44] Kooistra, K., Mesman, H., de Waal, M., Koppelman, M. & Zaaijer, H., (2011). Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among, *Dutch blood donors*, 2003-2009, *Vox Sang*, 100(3). 261-6.

- [45] Williams, M. D., Cohen, B. J., Beddall, A. C., Pasi, K. J., Mortimer, P. P. & Hill, F. G., (1990). Transmission of human parvovirus B19 by coagulation factor concentrates, *Vox Sang*, 58, 177–181.
- [46] Broliden, K., (2001). Parvovirus B19 infection in pediatric solid organ and bone marrow transplantation, *Pediatr Transplant*, 5, 320–330.
- [47] Daly, P., Corcoran, A., Mahon, P. B. & Doyle, S., (2002). High-sensitivity PCR detection of parvovirus B19 in plasma, *J. Clin. Microbiol*, 40, 1958–1962.
- [48] Kurtzman, G. J., Cohen, B. J., Field, A. M., Oseas, R., Blaese, R. M. & Young, N. S., (1989). Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection, *J. Clin. Invest*, 84, 1114–1123.
- [49] Pasquinelli, G., Bonvicini, F., Foroni, L., Salfi, N. & Galinella, G., (2009). Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19, *J. Clin. Virol*, 44, 33–38.
- [50] Hsu, S., Chen, Yi, Huang, Y., Yeh, T. T., Chen, W. C., Ho, E. S. & Chou, M. M., (2007). Prenatal diagnosis and perinatal management of maternal–fetal congenital parvovirus B19 infection, *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46, 417–422.
- [51] Woolf, A. D., Campion, G. V., Chishich, A., Wise, S. & Cohen, B. J., (1989). Clinical Manifestations of human parvovirus B19, *Arch. Intern. Med*, 149, 1153 – 1156.
- [52] Anderson, M. J., Davis, L. R., Hodgson, J., Jones, S. E. & Murtaza, L., (1982). Occurrence of infection with a parvovirus – like agent in children with sickle cell anemia during a two – year period, *J. Clin. Pathol*, 35, 744 – 749.
- [53] Balfour, H J., (1969). Erythma Infectiosum, *Clin Pediatr*, 8, 721 – 727.
- [54] Chorba, T., Coccia, P., Holman, R. C., Tattersall, P., Anderson, L. J. & Sudman, J., (1986). The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J. Infect Dis*, 154, 383-93.
- [55] Woolf, A. D., Campion, G. V., Chishick, A., Wise, S., Cohen, B. J. & Klouda, P. T., (1989). Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults, *Arch Intern Med*, 149, 1153-6.
- [56] Parvovirus B19, In: American Academy of Pediatrics., (1997). Red book: report of the Committee on Infectious Diseases. 24th ed. Elk Grove Village, Ill: *American Academy of Pediatrics*, 383-385.

- [57] Reid, D. M., Ried, T. M., Brown, T., Rennie, J. A. & Eastmond, C. J., (1985). Human Parvovirus – associated arthritis, *Lancet*, 1(8426), 422 – 425.
- [58] Joseph, P. R., (1986). The frequency of joint involvement in adults, *N.Y.State. J. Med*, 86, 560 – 563.
- [59] Woolf, A. D., (1990). Human Parvovirus B19 and arthritis Behring Inst, *Mitt*, 85, 64 – 68.
- [60] Katz, V. L., McCoy, M. C., Kuller J. A & Hansen W. F., (1996). An association between fetal parvovirus B19 infection and fetal anomalies. *Am. J. Perinatol*, 13, 43-45.
- [61] Anand, A., Gray, E. S., Brown, T., Clewley, J. P. & Cohen, B. J., (1987). Human Parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis, *N. Engl. J. Med*, 316, 183 – 186.
- [62] Wright, C., Hinchliffe, A. & Taylor, C., (1996). Fetal pathology in intrauterine death due to parvovirus B19 infection, *Br. J. Obstet. Gynaecol*, 103, 133 – 136.
- [63] Eis – Hubinger, A. M., Dieck, D., Schild, R., Hansmann, M. & Schneweis, K.E., (1998). Parvovirus B19 infection in pregnancy, *Intervirology*, 41, 178 – 184.
- [64] Enders, G. & Biber, M., (1990). Parvovirus B19 infection in pregnancy. Behring Inst. *Mitt*, 85, 74 – 78.
- [65] Yaegashi, N., Niinuma, T., Chisaka, H., Uehara, S. & Okamura, K., (1999). Serologic study of human Parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan, *J. Infect*, 38, 30 – 35.
- [66] Schild, R. L., Bald, R., Plath, H., Eis-Hubinger, A. M. & Enders, G., (1999). Intrauterine management of fetal Parvovirus B19 infection, *Ultrasound Obstet. Gynaecol*, 13, 161 – 166.
- [67] Forestier, F., Tissot, J. D., Vial, Y., Daffos, F. & Hohlfield. P., (1999). Hematological parameters of parvovirus B19 infection in 13 fetuses with hydrops fetalis, *Br. J. Hematol*, 104, 925 – 927.
- [68] Hemauer, A., Gigler, A., Garea, R., Reichle, A., Hanswolf, M. & Modrow, S., (1999). Infection of fetus by parvovirus B19, *Journal of general virology*, 80, 627-630.

- [69] Taksaphan S., Kleebkaw, P., Komwilaisak, R., Kiatchoosakun, P., Jirapradittha, J. & Ratanasiri, T., (2006). Hydrops Fetalis Caused by Parvovirus B19 Infection: Case Report and Literature Review, *J. Med. Assoc. Thai.*, 89(8), 1277-86.
- [70] Sheikh, A. U., Ernest, J. M. & O'shea, M., (1992). Long – term outcome in fetal hydrops from parvovirus B19 infection, *Am. J. Obstet. Gynaecol*, 167, 337 – 341.
- [71] Yaegashi, N., Niinuma, T., Chisaka, H., Watanabe, T. & Uehara, S., (1998). The incidence of, and factors leading to parvovirus B19 – related hydrops fetalis following maternal infection, *J. Infect*, 37, 28 – 35.
- [72] Smoleniec, J. S. & Pillai, M., (1994). Management of fetal hydrops associated with parvovirus B19 infection, *Br. J. Obstet. Gynaecol*, 101, 1079 – 1081.
- [73] Baranski, B. & Young, N. S., (1987). Hematologic consequences of viral infections, *Hematol Oncol Clin North Am*, 1(2), 167-83.
- [74] Kaplan, C. I., Morinet, F. I. & Cartron, J., (1992). Virus – induced alloimmune thrombocytopenia and neutropenia, *Semin Hematol*, 29, 34 – 44.
- [75] Ozawa K., Ayub, J., Kajigaya, S., Shimada, T. & Young, N., (1988). The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells, *J. Virol*, 62, 2884-2889.
- [76] Hanada, T., Koike, K., Hirano, C., Takeya, T. & Suzuki, T., (1989). Childhood transient erythro-blastopenia complicated by thrombocytopenia and neutropenia, *Eur. J. Hematol*, 42, 77 – 80.
- [77] Doran, H. M. & Teall, A. J., (1988). Neutropenia accompanying erythroid aplasia in human parvovirus infection, *Br. J. Hematol*, 69, 287-288.
- [78] McClain, K., Estrov, Z., Chen, H. & Mahoney, D. H., (1993). Chronic neutropenia of childhood: frequent association with parvovirus infection and correlations with bone marrow culture studies, *Br. J. Hematol*, 85, 57 – 62.
- [79] Cassinotti, P., Schultze, D., Schlageter, P., Chevili, S. & Siegl, G., (1993). Persistent human parvovirus B19 infection following an acute infection with meningitis in an immunocompetent patient, *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis*, 12, 701-704.
- [80] Nigro, G., Eufemia, P. D., Zerbini, M., Krzysztofiak, A. & Finochiaro, R., (1994). Parvovirus B19 infection in a hypogammaglobulinemic infant with

neurologic disorders and anemia: successful immunoglobulin therapy, *Pediatr Infect. Dis. J.*, 13, 1019-1021.

- [81] Berry, P. J., Gray, E. S., Porter, H. J. & Burton, P. A., (1992). Parvovirus infection of the human fetus and newborn, *Semin. Diagn Pathol*, 9, 4-12.
- [82] Chia, J. K. & Jackson, B., (1996). Myopericarditis due to parvovirus B19 in adult, *Clin. Infect. Dis.*, 23, 200-201.
- [83] Nour, B., Green, M., Michaels, M., Reyes, J. & Tzakis, A., (1993). Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients, *Transplantation*, 56, 835-838.
- [84] Murry, C. E., Jerome, K. R. & Reichenbach, D. D., (2001). Fetal parvovirus myocarditis in a 5 – Year old girl, *Hum. Pathol*, 32, 342 – 345.
- [85] Sokal, E. M., Melchior, Mş, Cornu, C., Vandenbroucke, A. T. & Buts, J. P., (1997). Acute parvovirus B19 infection associated with fullminant hepatitis of favorable prognosis in young children, *Lanset*, 349, 1063-1065.
- [86] Notari. E. P., Lorton, S., Cable, R. G., Grindon, A. J., Lenes, B. A., et al. Seroprevalence of known and putative hepatitis markers in United States blood donors with ALT levels at least 120IU per L. *Transfuion* 2001;41:751-755.
- [87] Pardi, D. S., Romero, Y., Mertz, L. E. & Douglas, D. D., (1998). Hepatitis – associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection, *Am. J. Gastroenterol*, 93, 468 – 470.
- [88] Nigro, G., Zerbini, M., Krzysofiak, A., Gentilomi, G. & Porcaro, M. A., (1994). Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease, *Lancet*, 343, 1260-1261.
- [89] Magro, C. M., Dawood, M. R. & Crowson, A. N., (2000). The cutaneous manifestations of human parvovirus B19 infection, *Hum Pathol*, 31, 488-497.
- [90] Diaz, F. & Collazos, J., (2000). Glumerulonephritis and Henoch- Schoenlein purpura associated with acute parvovirus B19infection, *Clin Nephrol*, 53, 237-238.
- [91] Kurtzman, G., Frickhofen, N., Kimball, J., Jenkins, D. W. & Nienhuis, A. W., (1989). Pure red cell aplasia of 10 years duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N. Engl. J. Med.*, 1989;321:519-523.

- [92] Koch, W. C., Massey, G., Russell, C. E. & Adler, S. P., (1990). Manifestations and treatment of parvovirus B19 infection in immunocompromised patients, *J. Pediatr*, 116. 355-359.
- [93] Kurtzman, G. J., Ozawa, K., Cohen, B., Hanson, G. & Young, N., (1987). Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection, *N. Engl. J. Med.*, 317, 287 – 294.
- [94] Chen, M. Y., Hung, C. C., Fang, C. T. & Hsieh, S. M., (2001). Reconstituted immunity against persistent parvovirus B19 infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome after highly active antiretroviral therapy, *Clin. Infect. Dis.*, 32. 1361-1365.
- [95] Abkowitz, J. L., Brown, K.E., Wood, R. W., Kovach, N. L. & Green, S. W., (1997). Clinical relevance of parvovirus B19 as a cause of anemia in patients with human immunodeficiency virus infection, *J. Infect. Dis.*, 176, 269 – 273.
- [96] Azzi, A., Macchia, P.A., Favre, C., Nardi, M. & Zakrzewska, K., (1989). Aplastic crisis caused by B19 virus in a child during induction therapy for acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica*, 74, 191-194.
- [97] Heegaard, E. D. & Schmiegelow, K., (1999). Serologic study on parvovirus B19 infection in childhood acute lymphoblastic leukemia during chemotherapy: clinical and Hematologic complications, *J. Pediatr Hematol Oncol*, 88, 614 – 617.
- [98] Heegaard, E. D., Madsen, H. O. & Schmiegelow, K., (2001). Transient pancytopenia preceding acute lymphoblastic leukemia, *Br. J. Hematol*, 114, 810 – 813.
- [99] Reiner, A. P. & Spivak, J. L., (1988). Hematophagic histiocytosis, *Medicine*, 67, 369 – 388.
- [100] Chorba, T., Coccia, P., Holman, R. C., Tattersall, P. & Anderson, M. J., (1986). The Role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythma infectiosum, *J. Infect. Dis.*, 154, 383 – 393.
- [101] Serjeant, G. R., Topley, J. M., Mason, K., Serjeant, B. E. & Pattison, J. R., (1981). Out break of aplastic crisis associated with parvovirus – like agent, *Lancet*, 2(8247), 595-7.
- [102] Rao, S. P., Miller, S. T. & Cohen, B. J., (1992). Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease, *Am. J. Dis. Child.*, 146, 1328 – 1330.

- [103] Serjeant, B. E., Hambleton, R. R., Kerr, S., Kilty, C. G. & Serjeant, G. R., (2001). Hematological response to parvovirus B19 infection in homozygous sickle – cell disease, *Lancet*, 358, 1779 – 1780.
- [104] Quian, X. H., Zhang G. C. & Jiao, X. Y., (2002). Aplastic anemia associated with parvovirus B19 infection, *Arch. Dis. Child.*, 87, 436-437.
- [105] Muir, K., Todd, W. T., Watson, W. H. & Fitzsimons, E., (1992). Viral – associated hemophagocytosis with parvovirus B19 related pancytopenia, *Lancet*, 339, 1139 – 1140.
- [106] Bell, L. M., Naides, S. J., Stoffman, P., Hodinka, R. L. & Plotkin, S. A., (1989). Human parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients, *N. Engl. J. Med.*, 321, 85-91.
- [107] Kinney, J. S., Anderson, L. J., Farrar, J., Strikas, R. A., Kumar, M. L. & Kliegman, R. M., (1988). Risk of adverse outcomes of pregnancy after human parvovirus B19 infection, *J. Infect. Dis.*, 57, 663-667.
- [108] Yaegashi, N., Niinuma, T., Chisaka, H., Uehara, S., Okamura, K., Shinkawa, O., Tsunoda, A., Moffatt, S., Sugamura, K. & Yajima, A., (1999). Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan, *J. Infect.*, 38(1), 30-35.
- [109] Jensen, I. P., Schou, O. & Vestergaard, B. F., (1994). The human parvovirus B19 epidemic in Denmark, *APMI*, 106, 843-848.
- [110] Iwa, N. & Yutani, C., (1995). Cytodiagnosis of Parvovirus B19 infection from ascites fluid of hydrops fetals: report of a case, *Diagn Cythopathol*, 13, 139–141.
- [111] Pasquinelli, G., Bonvicini, F., Foroni, L., Salfi, N. & Galinella, G., (2009). Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19, *J. Clin. Virol*, 44, 33–38.
- [112] Pankuweit, S., Ruppert, R., Eckhardt, H., Strache, D. & Maisch, B., (2005). Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory myocardial diseases with a special focus on Parvovirus B19, *J. Vet. Med. B.*, 52, 344–347.
- [113] Landolsi, H., Yacoubi, M. T., Bouslama, L., Lahmar, A., Trabelsi, A., Hmissa, S., Aouni, M. & Korbi, S., (2009). Detection of the human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis using immunohistochemistry and nested-PCR in formalin fixed and paraffin embedded placenta and fetal tissues, *Pathol Biol*, 57(3), e1-7.

- [114] Michel, P., Makela, A., Korhonen, E., Toivola, J., Hedman, L., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K. & Oker-Blom, C., (2008). Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells, *J. Virol Methods*, 152, 1–5.
- [115] Brown, C. S., Salimans, M. M., Noteborn, M. H. & Weiland, H. T., (1990). Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression system, *Virus Res.*, 15, 197–211.
- [116] Manaresi, E., Zuffi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Zebrini, M. & Musiani, M., (2001). Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins, *J. Med. Virol*, 64, 67–73.
- [117] Kerr, S., O’Keeffe, G., Kilty, C. & Doyle, S., (1999). Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG, *J. Med. Virol*, 57, 179–185.
- [118] Ferguson, M., Walker, D. & Cohen, B., (1997). Report of a collaborative study to establish the international standard for parvovirus B19 serum IgG, *Biologicals*, 3, 283–288.
- [119] Shackelton, L. A. & Holmes, E. C., (2006). Phylogenetic evidence for rapid evolution of human parvovirus B19, *J. Virol*, 80, 3666–3669.
- [120] Salimans, M., Holsappel, S., Van de Rijke, F., Jiwa, N. M., Raap, A. K. & Weiland, H. T., (1989). Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction, *J. Virol Methods*, 23, 19–28.
- [121] Koppelman, M. H., Van Swieten, P. & Cuijpers, H. T., (2010). Real-time polymerase chain reaction of parvovirus B19 DNA in blood donations using a commercial and in-house assay, *Transfusion*, 51(6), 1346-1354.
- [122] Saldanha, J., Lelie, N., Yu, M. W. & Heath, A., (2002). Collaborative study group. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human Parvovirus B19 nucleic acid amplification techniques, *Vox Sang*, 82, 24–31.
- [123] Baylis, S., Chudy, M., Blumel, J., Pisani, G., Candotti, D., Jos’e, M. & Heath, A., (2010). Collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for Parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays, *Vox Sang*, 98, 441–446.

- [124] Corcoran, A. & Doyle, S., (2004). Advances in the biology, diagnosis and host–pathogen interactions of parvovirus B19, *J. Med Microbiol*, 53, 459–475.
- [125] Yu, M., Alter, H. J., Virata-Theimer, M. L. A., Geng, Y., Ma, L., Schechterly, C., Colvin, C. & Luban, N., (2010). Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples, *Transfusion*, 50, 1712–1721.
- [126] Geng, Y., Wu, C. G., Bhattacharyya, S. P., Tan, D., Guo, Z. P. & Yu. M. W., (2007). Parvovirus B19 DNA in factor VIII concentrates: effects of manufacturing procedures and B19 screening by nucleic acid testing, *Transfusion*, 47, 883–889.
- [127] Doyle, S., (2011). The detection of parvoviruses, *Methods Mol. Biol.*, 665, 213–231.
- [128] Chen, H., Zhang, J., Yang, S., Ma, L. N., Ma, Y. P., Liu, X. T., Cai, X. P., Zhang, Y. G. & Liu, Y. S., (2009). Rapid detection of porcine parvovirus DNA by sensitive loop-mediated isothermal amplification, *J. Virol Methods*, 158, 100–103.
- [129] Guo, Y. M., Ishii, K., Hirokawa, M., Tagawa, H., Ohyagi, H., Michishita, Y., Ubukawa, K., Yamashita, J., Ohteki, T., Onai, N., Kawakami, K., Xiao, W. & Sawada, K., (2010). CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells, *Blood*, 15(22), 4569–4579.
- [130] Hsu, G. J., Tzang, B. S., Tsai, C. C., Chiu, C. C., Huang, C. Y. & Hsu, T. C., (2011). Effects of human parvovirus B19 on expression of defensins and Toll-like receptors, *The Chinese Journal of Physiology*, 54(5), 367–76.
- [131] Sato, H., Hirata, J., Furukawa, M., Kuroda, N., Shiraki, H., Maeda, Y. & Okochi, K., (1991). Identification of the region including the epitope for a monoclonal antibody which can neutralize human parvovirus B19, *Journal of Virology*, 65(4), 1667–1672.
- [132] Anderson, S., Momoeda, M., Kawase, M., Kajigaya, S. & Young, N. S., (1995). Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits, *Virology*, 206(1), 626–632.
- [133] Söderlund, M., Brown, C. S., Cohen, B. J. & Hedman, K., (1995). Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity, *Journal of Infectious Diseases*, 171(3), 710–713.

- [134] Söderlund, M., Brown, C., Spaan, W. J. M., Hedman, L. A. & Hedman, K., (1995). Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19, *Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1431–1436.
- [135] Von Poblitzki, A., Gigler, A., Lang, B., Wolf, H. & Modrow, S., (1995). Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals, *Journal of General Virology*, 76(3), 519–527.
- [136] Tolfvenstam, T., Lundqvist, A., Levi, M., Wahren, B. & Broliden, K., (2006). Mapping of B-cell epitopes on human Parvovirus B19 of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1367–1375.
- [137] Corcoran, A., Mahon, B.P. & Doyle, S. (2004). B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1, *Journal of Infectious Diseases*, 189(10), 1873–1880.
- [138] Von Poblitzki, A., Gerdes, C., Reischl, U., Wolf, H. & Modrow, S., (1996). Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19, *Journal of Virology*, 70(10), 7327–7330.
- [139] Franssila, R., Hokynar, K. & Hedman, K., (2001). T helper cell mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19, *Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 805–809.
- [140] Tolfvenstam, T., Oxenius, A., Price, D. A., Shacklett, B.L., Spiegel, H.M., Hedman, K., Norbeck, O., Levi, M., Olsen, K., Kantzanou, M., Nixon, D.F., Broliden, K. & Klennerman, P., (2001). Direct ex vivo measurement of CD8+ T-lymphocyte responses to human parvovirus B19, *Journal of Virology*, 75(1), 540–543.
- [141] Isa, A., Norbeck, O., Hirbod, T., Lundqvist, A., Kasprovicz, V., Bowness, P., Klennerman, P., Broliden, K. & Tolfvenstam, T., (2006). Aberrant cellular immune responses in humans infected persistently with parvovirus B19, *Journal of Medical Virology*, 78(1), 129–133.
- [142] Isa, A., Kasprovicz, V., Norbeck, O., Loughry, A., Jeffery, K., Broliden, K., Klennerman, P., Tolfvenstam, T. & Bowness, P., (2005). Prolonged activation of virus-specific CD8+ T cells after acute B19 infection, *PLoS Medicine*, 2(12), 1280–1291.
- [143] Kasprovicz, V., Isa, A., Jeffery, K., Broliden, K., Tolfvenstam, T., Klennerman, P. & Bowness, P., (2006). A highly restricted T cell receptor dominates the CD8+ T-cell response to parvovirus B19 infection in HLA-A*2402-positive individuals, *Journal of Virology*, 80(13), 6697–6701.

- [144] Franssila, R. & Hedman, K., (2004). "T-helper cell-mediated interferon- γ , interleukin-10 and proliferation responses to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19". *Vaccine*, vol. 22, no. 27-28, pp. 3809–3815.
- [145] Franssila, R., Auramo, J. & Modrow, S., (2005). T helper cell mediated interferon-gamma expression after human parvovirus B19 infection: persisting VP2-specific and transient VP1u-specific activity, *Clinical and Experimental Immunology*, 142(1), 53–61.
- [146] Kasprowicz, V., Isa, A., Tolfvenstam, T., Jeffery, K., Bowness, P. & Klennerman, P., (2006). Tracking of peptide-specific CD4+ T-cell responses after an acute resolving viral infection: a study of parvovirus B19, *Journal of Virology*, 80(22), 11209–11217.
- [147] Isa, A., Lundqvist, A., Lindblom, A., Tolfvenstam, T. & Broliden, K., (2007). Cytokine responses in acute and persistent human parvovirus B19 infection, *Clinical and Experimental Immunology*, 147(3), 419–425.
- [148] Kajigaya, S., Shimada, T., Fujita, S. & Young, N. S., (1989). A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7601–7605.
- [149] Baylis, S. A. & Buchheit, K. H., (2009). A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19, *Vox Sanguinis*, 97(1), 13–20.
- [150] Bonvicini, F., Filippone, C., Delbarba, S., Manaresi, E., Zerbini, M., Musiani, M. & Gallinella, G., (2006). Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit, *Virology*, 347(2), 447–454.
- [151] Bonvicini, F., Manaresi, E., Di Furio, F., De Falco, L. & Gallinella, G., (2012). Parvovirus B19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression, *PLoS ONE*, 7(3), e33316.
- [152] Musiani, M., Zerbini, M., Gentilomi, G., Plazzi, M., Gallinella, G. & Venturoli, S., (1995). Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection, *Journal of Infectious Diseases*, 172(5), 1360–1363.
- [153] Lefrère, J. J., Servant-Delmas, A., Candotti, D., Mariotti, M., Thomas I., Brossard, Y., Lefrère, F., Girot, R., Allain, JP. & Laperche, S., (2005). Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety, *Blood*, 106(8), 2890–2895.

- [154] Ki, C. S., Kim, I. S., Kim- J. W., Lee- N. Y., Kim, S. H., Lee, K. W., Kim, S. J., Joh, J. W., Huh, W. S. & Oh, H. Y., (2005). Incidence and clinical significance of human parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients, *Clin Transplant*, 19(6),751-755.
- [155] Čapenko, S., Kozireva, S., Folkmane, I., Bernarde, K., Rozentāls, R. & Murovska, M., (2012). Anemia as a Complication of Parvovirus B19 Infection in Renal Transplant Recipients, *Medicina* (Kaunas), 48(6), 299-304.
- [156] Khameneh, Z. R. Sepehrvand, N., Sohrab V. & Ghasemzadeh, N., (2014). The Seroprevalence of Parvovirus B19 among Kidney Transplant Recipients: A Single-center Study, *Saudi J. Kidney Dis. Transplantation*, 25(1), 16-21.
- [157] Ki, C. S., Kim, I. S., Kim, J. W., Lee, N. Y., Kim, S. H., Lee, K. W., Kim, S. J., Joh, J. W., Huh, W. S. & Oh, H. Y., (2005). Incidence and clinical significance of human parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients, *Clin Transplant*, 19(6),751-755.
- [158] Xiao, C., Wang, C. X., Liu, L. S. & Fu, Q., (2013). Clinical Investigation of Human Parvovirus B19 Infection After Renal Transplantation in China, *Transplantation Proceedings*, 45(4), 1593–1599.
- [159] Carraturo, A., Catalani, V., Ottaviani, D., Menichelli, P., Rossini, M., Terella, D. & Biondi, B., (2012). Parvovirus B19 Infection and Severe Anemia in Renal Transplant Recipients, *The Scientific World Journal*, 2012, 102829.
- [160] Diab, A., (2013). Analysis of Parvovirus B19 Infection in Renal Transplant Recipients, *African Journal of Microbiology Research*, 7(10), 909-912.
- [161] Hlail, Z., Abdulamir, A. & Alsaedi, A., (2017). The seroPrevalence of parvovirus B19 among kidney transplant recipients, *Iraqi JMS*, 15(1), 88-93.
- [162] Elnifro, E., Nisha, A. K., Almabsoot, M., Daeki, A., Mujber, N. & Muscat, J., (2009). Seroprevalence of parvovirus B19 among pregnant women in Tripoli, Libya, *J. Infect. Dev. Ctries.*, 3, 218–220.
- [163] URL-1 Şekil 2.3.(2007). B19 virüs enfeksiyonunun patogenezi [www. MicrobiologyBytes.com](http://www.MicrobiologyBytes.com) adresinden alınmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Musbah Emhamed Farag ALMBSUOT
Doğum Yeri ve Yılı : 1975 / Libya
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : musbahalmbsuot@gmail.com



Eğitim Durumu

Lisans : Musrata Üniversitesi Medikal Teknoloji Fakültesi Laboratuvar Bölümü Medikal Laboratuvar Lisans Bölümü, 1997
Yüksek Lisans : Libyan Akademi Mikrobiyoloji Bölümü Hayat Bilimleri Yüksek Lisans Derecesi, 2008

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Sedi Alseed Tarhuna Sağlık Merkezinde Tıbbi Laboratuvar Başkanı 1999-2008
İş Yeri : Alzuetina Üniversitesi Üyesi, Biyoloji Bölüm Başkanı, Eğitim Fakültesi 2009-2013

Yayınları

- Elnifro, E., Nisha, A. K., Almabsuot, M., Daeki, A., Mujber, N. & Muscat, J., (2009). Seroprevalance of parvovirus B19 among pregnant women in Tripoli, Libya, *J. Infect. Dev. Ctries.*, 3, 218–220.
- Rajab, B., Almabsuot, M. & Kıran, B., (2019). The Frequency of Intestinal Parasites among Patients in Zliten and Al-Khums Training Hospitals. *International Journal of Science and Research*, 8(1), 716-719.
- Almabsuot, M. & Kıran, B., (2018). The Seropositivity of Parvovirus B19 Among Kidney Transplant Recipients in Libya. *Intenational Congress on Engineering and Life Science*, Kastamonu, (1), 166
- Elnifro, E., Almabsuot, M., Rajab, B. & Kıran, B., (2019). Seroprevalance Of Parvovirus B19 Among Kidney Transplant İn Libya. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(04), 998-1003.