

خون

دوره ۵ شماره ۱ بهار ۸۷ (۴۷-۵۲)

شیوع پاروویروس B19 انسانی در اهداکنندگان خون به روش الایزا و PCR

فاطمه محمودی^۱، دکتر محمود محمودیان شوشتاری^۲، دکتر زهره شریفی^۳، دکتر سید مسعود حسینی^۴

چکیده سابقه و هدف

پاروویروس B19 انسانی، ویروسی بسیار کوچک با DNA تک رشته‌ای، بدون پوشش و عضو خانواده پاروویریده می‌باشد. پاروویروس B19 انسانی موجب بروز تعدادی از بیماری‌های بالینی شامل اریتمای عفونی (بیماری پنجم)، هیدروپیس فتالیس، بحران آپلاستیک کذرا، آرتروپاتی و کم خونی مادرزادی می‌شود. انتقال ویروس از طریق تنفس، انتقال خون و فرآورده‌های خونی است. B19 از طریق روش‌های حساس PCR قابل تشخیص است. بررسی‌های قبلی نشانگر آن است که افرادی که ایمونوگلوبولین از نوع IgG ضد ویروس در خونشان ظاهر شده، از نظر وجود ویروس منفی هستند. آنتی‌بادی‌های کلاس IgM پاروویروس B19 انسانی به طور معمول برای چندین ماه و آنتی‌بادی کلاس IgG پاروویروس B19 برای چندین سال و حتی تا پایان عمر دوام دارند. هدف این مطالعه تعیین شیوع پاروویروس B19 انسانی در بین اهداکنندگان خون در تهران بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مقطعی بود. به روش نمونه‌گیری تصادفی، سرم ۷۳۰ اهداکننده خون که از نظر anti-HCV Ab و HBsAg، HIV Ab روش الایزا بررسی شدند. سپس نمونه تمام سرم‌ها برای حضور DNA ویروس با روش semi-nested PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

از میان ۷۳۰ اهداکننده خون، ۴ نفر (۰/۰%) در سرم آنتی‌بادی خاص IgM مثبت بودند و سرم این افراد برای anti-B19 مثبت گزارش شد. از میان این تعداد اهداکننده، ۳۳۸ نفر (۴۶/۳٪، CI ۴۲/۷-۵۰٪) برای آنتی‌بادی خاص IgG مثبت بودند. B19 ای پاروویروس DNA می‌باشد. مطالعات بیشتری بر روی تعداد زیادی از اهداکنندگان و همچنین گروه‌های پر خطر لازم است.

کلمات کلیدی: پاروویروس، اهداکنندگان خون، شیوع، PCR

تاریخ دریافت : ۸۶/۱/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۶/۱/۱۶

- ۱- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی - دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD ویروس‌شناسی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
- ۳- PhD ویروس‌شناسی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
- ۴- PhD ویروس‌شناسی - استادیار دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی

اهداکنندگان خون انجام شد، از بین ۳۰۰۰ واحد خون اهدایی که به روش PCR بررسی شده بود، فقط یک مورد مثبت وجود داشت، و طبق همین مطالعه شیوع IgG anti B19، ۵۴ درصد گزارش شد(۱۷).

در این مطالعه مقطعی و تصادفی، شیوع پاروویروس B19 در میان اهداکنندگان خون که به پایگاه تهران مراجعه کرده بودند، به روش الیزا و semi-nested PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی شیوع پاروویروس B19 در میان ۷۳۰ اهداکننده خون ۱۷ تا ۶۵ ساله که تصادفی انتخاب شده و از شهریور ماه تا اسفند ماه ۱۳۸۴ به پایگاه تهران مراجعه نموده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. برای تحلیل داده ها از برنامه نرم افزاری SPSS و از آزمون های مجدور کا (Chi-square) استفاده شد (با اختلاف معنی دار $p < 0.05$). آنتی بدی های IgM و IgG با به کارگیری کیت الیزا تجاری (IBL هامبورگ - آلمان)، بررسی شدند. اجرای مراحل، مطابق دستور العمل کیت بود.

B19 Semi-nested PCR برای بررسی حضور DNA ای انجام شد. استخراج B19 از سرم اهداکنندگان با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک با خلوص بالا (High Pure Nucleic acid Kit) با علامت تجاری روش مطابق دستور العمل کیت انجام شد. پس از استخراج DNA ای ویروس B19، به منظور تولید آنبوه ژنوم ویروس از روش semi-nested PCR، از مواد مورد نیاز به شرح زیر استفاده شد:

۲ میکرولیتر بافر PCR با غلظت X ، $10 \mu\text{l}$ /۰۴ داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) با غلظت $10 \mu\text{mM}$ ، $1 \mu\text{mM}$ کلرید منیزیم (MgCl_2) با غلظت $25 \mu\text{M}$ ، $2.5 \mu\text{l}$ $0.3 \mu\text{l}$ پلیمراز با غلظت $5 \mu\text{l}$ واحد، $1 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{M}$ آب دیونیزه و در نهایت $1 \mu\text{l}$ از هر یک از آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) با غلظت $10 \mu\text{M}$. در مرحله اول مطالعه در سال ۱۹۹۳ که توسط سوجیمارا بر روی

WBC ویروسی ساده و کوچک، ایزو متريک، بدون پوشش کپسید و با قطر 18 تا 26 نانومتر است (۱، ۲). برای همانندسازی نيازمند ویروس های کمکی نمی باشد (۳، ۴). ژنوم B19 شامل DNA ای تک رشته خطی با قطبیت مثبت و منفی به طول تقریبی 5600 نوکلئوتید است (۴، ۳). این ژنوم دو پروتئین ساختاری VP1 و VP2 و پروتئین غیر ساختاری NS1 را کد می کند (۴). ویروس B19 برای همانندسازی، به سلول های اجدادی اریتروپیت در مغز استخوان وابسته است که در طی همانندسازی این سلول ها را تخریب می کند (۵، ۴).

ویروس B19 با طیف وسیعی از ناهنجاری های بالینی همراه است که این الگو تحت تاثیر سن و وضعیت ایمونولوژیک میزبان می باشد (۷، ۶). اختلالات عصبی، اریتمای عفونی، آرتروپاتی های بعد از عفونت، بحران آپلاستیک گذرا در بیمارانی با اختلالات خونی و نقص مزمن مغز استخوان در افرادی با این می سرکوب شده، ناشی از ویروس B19 است. در بیماران مبتلا به هپاتیت، B19 می تواند منشا فعالیت هپاتیت شود (۸-۱۴).

در کودکان شایع ترین ظهور کلینیکی عفونت B19 بیماری پنجم یا اریتمای عفونی است (۱۵، ۱۶). عفونت در دوران بارداری ممکن است موجب کم خونی جنین، سقط جنین و هیدروپیس فتالیس شود (۱۶).

WBC ویروسی مقاوم به حرارت و هم چنین مقاوم به تعداد زیادی مواد فیزیکوشیمیایی است و در دمای 60°C به مدت بیش از 12 ساعت زنده می ماند (۱۶). با این که اکثر از طریق تنفسی منتقل می شود، خون و محصولات خونی نیز می تواند موجب انتقال B19 شود (۱۶). فراوانی خطر انتقال B19 از طریق خون و فرآورده های خونی بر اساس حساسیت روش های تشخیصی و هم چنین شرایط فصل ایدمی از 1 به 50000 تا 1 به 625 متغیر است (۱۶). علی رغم شیوع بالای آنتی بادی علیه ویروس، در بین افراد جامعه میزان ویرمی نادر می باشد. آنتی بادی های کلاس IgM علیه ویروس به طور معمول برای چندین ماه و آنتی بادی کلاس IgG برای چندین سال دارند. در یک مطالعه در سال ۱۹۹۳ که توسط سوجیمارا بر روی

جدول ۱: توزیع فراوانی شیوع آنتی‌بادی IgM و IgG در بین اهداکنندگان خون

B19	آنتی‌بادی IgG علیه	B19	آنتی‌بادی IgM علیه
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی
۴۶/۳	۳۳۸	۰/۵	۴
۵۳/۷	۳۹۲	۹۹/۵	۷۲۶
۱۰۰	۷۳۰	۱۰۰	۷۳۰
			مجموع

نتایج حاصل از PCR semi-nested و ژل الکتروفورز نمونه B19 در شکل ۱ نشان داده شده است که نشانگر منفی بودن تمام نمونه‌ها برای DNA B19 است.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR semi-nested مربوط به پاروویروس B19 بر روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون‌های ۱ و ۲ کنترل منفی، ستون ۳ ستون ۱۰۰ bp (نشانگر ladder) با علامت تجاری Roche (Roche)، ستون‌های ۵ و ۶ کنترل مثبت (با طول باند ۷۱۷ bp)، ستون ۴ و ۷ به بعد نشانگر PCR نمونه سرم اهداکنندگان خون می‌باشد.

بحث

بررسی‌های قبلی نشانگر آن است که افرادی که ایمونوگلوبولین از نوع IgG در خونشان ظاهر شده از نظر وجود ویروس منفی هستند. در حال حاضر، آزمایش DNA B19 بر روی پلاسمای افرادی که دارای IgG ضد ویروس هستند نشان داده است که در خون تعداد قابل ملاحظه‌ای از این افراد، مقادیر کمی از DNA B19 وجود دارد که از نظر انتقال خون مهم است (۱۸).

بر طبق مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۳ در فوکوکاژاپن توسط سوجیمارا و همکاران انجام شد، وجود ویرسی در بین اهداکنندگان سالم خون ۰/۰۳ درصد و شیوع anti-B19

(۷۲۵ bp ۵'-CAGACTTGAGCAGGTTATG-۳' و در مرحله دوم، از آغازگرهای VP₁ و NS₂ با توالی ۳'-AGCATCAGGAGCTATACTTCC-۵' (قطعه ۷۱۷ bp ۵'-CAGACTTGAGCAGGTTATG-۳') استفاده شد. در پایان، ۱۵ μl از آمیزه PCR به ۱ μl ۵ μl DNA استخراج شده افزوده شد. PCR در ۳۰ دور با این ترتیب دمایی و زمانی صورت گرفت: ۱ دقیقه دمای ۹۴°C برای مرحله تقلیب (denaturation)، ۳۰ ثانیه دمای ۵۸°C برای مرحله به هم پیوستن (annealing) و ۱ دقیقه دمای ۷۲°C برای مرحله ساخت DNA (extention). در مرحله دوم برای PCR با غلظت ۱۰ pmol از هر یک از آغازگرهای VP₁ و NS₂ اضافه شد. به منظور کنترل عمل استخراج DNA، از یک نمونه سرم منفی به عنوان کنترل منفی و از یک نمونه سرم مثبت به عنوان کنترل مثبت که به تایید بخش ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران حاوی نمونه B19 بود، استفاده شد. هم چنین برای کنترل آلودگی و عدم وجود مهارکننده در مرحله PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از کنترل مثبت کیت PCR پارووویروس B19 با برچسب ژن پاک (کنترل مثبت) استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز الکتروفورز حاوی اتیدیوم بروماید، به عنوان آشکار ساز، مورد بررسی قرار گرفت. برای تفسیر الکتروفورز ژل از نشانگر وزن مولکولی، نمونه سرمی حاوی DNA B19 و نمونه سرم منفی در مرحله عمل استخراج و کنترل منفی و مثبت در مرحله PCR استفاده گردید.

یافته‌ها

از میان ۷۳۰ اهداکننده خون، ۴ نفر (۰/۰%) در سرمشان آنتی‌بادی خاص IgM را دارا بودند و سرم این افراد برای B19 مثبت بود و در ۷۲۶ نفر (۹۹/۵%) منفی گزارش شد. از میان ۷۳۰ اهداکننده، ۳۳۸ نفر (۵۲/۷%) منفی گزارش شد. CI = ۴۲/۷-۵۲/۷٪، ۰/۴۶٪ برای آنتی‌بادی خاص IgG سرم مثبت بودند و در ۳۹۲ نفر (۵۳/۷%) سرم منفی گزارش شد (جدول ۱). هیچ رابطه معنی‌داری میان سن و جنس اهداکنندگان خون با میزان شیوع IgG anti - B19 وجود نداشت.

درصد و در آمریکا ۱٪ گزارش شده است(۲۴، ۲۵). در مطالعه ما، شیوع صفر درصدی DNA ویروس به معنای پایین بودن خطر انتقال B19 در بین اهداکنندگان می‌باشد. میزان شیوع DNA ویروس، باعث آسودگی ذخایر عظیم ۲۱٪ درصد گزارش شده است که به معنای بالا بودن خطر انتقال B19 است(۲۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی در مطالعه حاضر، از یک طرف شیوع IgG در میان اهداکنندگان تهرانی بالا بود و از طرف دیگر، هیچ یک از نمونه‌ها برای B19 DNA مثبت دیده نشد که این به معنای پایین بودن خطر انتقال ویروس از طریق انتقال خون می‌باشد. با آن که انتقال ویروس B19 از طریق خون و فرآورده‌های تک واحدی بسیار نادر است، ولی انتقال از طریق فرآورده‌های پلاسمایی گزارش شده است(۷). پیشنهاد می‌شود، مطالعات بیشتری بر روی تعداد زیادی از اهداکنندگان و هم چنین گروه‌های پرخطر از قبیل بیماران هموفیلی، تالاسمی و بیماران دیالیزی انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندهای مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از بخش ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون ایران که نهایت همکاری را در انجام این مطالعه مبذول داشته‌اند، اعلام می‌دارند.

IgG در بین آن‌ها ۵۴ درصد بود(۱۷). با توجه به بروز کم آسودگی با DNA B19 در بین اهداکنندگان، احتمال انتقال پاروویروس B19 صرفاً توسط یک واحد خون اهدایی بسیار کم است، اما یک واحد پلاسمای اهدایی در صورت وجود DNA ویروس، باعث آسودگی ذخایر عظیم پلاسمایی (pooled plasma) جمع‌آوری شده جهت پالایش می‌شود که در نهایت فرآورده‌های پلاسمایی به ویژه فاکتورهای انعقادی متراکم تهیه شده از این ذخایر، حاوی DNA B19 می‌باشد(۱۸).

میزان شیوع IgG anti-B19 در شیلی و چین ۵۵ درصد، در تونس ۴۳ درصد، در ایتالیا ۷۹ درصد و در اسپانیا ۶۵ درصد گزارش شده است(۱۹-۲۲). در مطالعه حاضر، میزان شیوع IgG در میان اهداکنندگان تهرانی خون ۴۶/۳ درصد می‌باشد که با میزان شیوع IgG در کشورهای در حال توسعه هم خوانی دارد. این میزان شیوع نشانگر عفونت گذشته با پاروویروس است.

هم چنین در مطالعه ما، میزان شیوع IgM anti-B19 فقط ۰/۵ درصد بود که دلالت بر عفونت اخیر با B19 دارد. در کشورهای دیگر مثل تونس و اسپانیا میزان شیوع سرمی IgM anti-B19 در بین جمعیت اهداکنندگان خون صفر و در بین اهداکنندگان خون امریکا ۱٪ گزارش شده است(۲۳، ۲۲، ۲۰).

در بررسی‌های دیگر، میزان شیوع DNA B19 در اهداکنندگان خون در پرتغال ۱۲٪، هلند از ۰/۰۳ تا ۰/۶

References :

- 1- Peterlana D, Puccetti A, Corrocher R, Lunardi C. Serological and molecular detection of human Parvovirus B19 infection. *Clinica Chimica Acta* 2006; 372:14-23.
- 2- Laub R, Strengers P. Parvoviruses and blood products. *Pathol Biol* 2002; 50(5): 339-48.
- 3- Ergaz Z, Ornoy A. Parvovirus B19 in pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2006; 21:421-35.
- 4- Kerr J, Bracewell J, Laing I, Matthey D, Bernstein R, Bruce I, et al. Chronic fatigue syndrome and arthralgia following parvovirus B19 infection. *The Journal of Rheumatology* 2002; 29: 3.
- 5- Heegaard E, Petersen B, Heilmann C, Hornsleth A. Prevalence of parvovirus B19 and parvovirus V9 DNA and antibodies in paired bone marrow and serum samples from healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 933-6.
- 6- Yazici AC, Aslan G, Baz K, Ikizoglu G, Api H, Serin MS, et al. A high prevalence of parvovirus B19 DNA in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2006;298(5): 231-5.
- 7- Prowse C, Ludlam CA. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang* 1997;72: 1-10.
- 8- Mahmoodian Shooshtari M, Nabi Foroghi M, Hamkar R. High prevalence of parvovirus B19 IgG antibody among hemophilia patients in center for special diseases, Shiraz, Iran. *Iranian J Publ Health* 2005; 34(1): 51-4.
- 9- Lefrere JJ, Maniez-Montreuil M, Morel P, Defer C, Laperche S. Safety of blood products and B19 parvovirus. *Transfus Clin Biol* 2006;13(4): 235-41.
- 10- Bonovicini F, Filipone C, Delbarba S, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M, et al. Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit. *Virology* 2006; 347: 447-54.
- 11- Ziayaean M, Rasouli M, Alborzi A. The seroprevalence of parvovirus B19 infection among to-be-married girls, pregnant women, and their neonates in Shiraz, Iran. *Jpn J Infect Dis* 2005;58: 95-7.
- 12- Gessel P, Gaytant M, Vossen A, Galama J, Ursem N, Steegers E, et al. Incidence of parvovirus B19 infection among an unselected population of pregnant women in the Netherlands: A prospective study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 128:46-9.
- 13- Takahashi Y, Murai Ch, Shibata Sh, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, et al. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 8227-32.
- 14- Bdour S. Risk of perinatal transmission of rubella and parvovirus B19 in Jordanian pregnant women. *Vaccine* 2006; 24: 3309-12.
- 15- Henriques I, Monterio F, Meireles E, Cruz A, Tavares G, Ferreira M, et al. Prevalence of parvovirus B19 and hepatitis A virus in Portuguese blood donors. *Transfusion and Apheresis Science* 2005; 33: 305-9.
- 16- Groeneveld K, van der Noordaa J. Blood products and parvovirus B19. *Neth J Med* 2003; 61(5): 154-6.
- 17- Tsujimara M, Matsushita K, Shiraki H. Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox Sang* 1995, 690: 206-12.
- 18- Azzi A, Morfini M. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfusion Medicine Reviews* 1999; 13(3): 194-204.
- 19- Wei Q, Li Y, Wang JW, Wang H, Qu JG, Hung T. Prevalence of anti-human parvovirus B19 IgG antibody among blood donors in Jilin province. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2006;20(2): 60-2 .
- 20- Regaya F, Khelifa R, Zouari R, Kchir M, Karoui M, Essid R. Research on parvovirus B19 infections and chronic articular manifestations in a Tunisian hospital. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2003; 80(1-4): 9-15.
- 21- Manaresi E, Gallinella G, Moreselli Labata AM, Zucchielli P, Zaccarelli D, Ambretti S, et al. Seroprevalence of IgG against conformational and linear capsid antigens of parvovirus B19 in Italian Blood donors. *Epidemiol Infect* 2004;135(5): 857-62.
- 22- Munoz S, Alonso MA, Fernandez MJ, Munaz JL, Garcia-Rodriguez JA. Seroprevalence versus parvovirus B19 in blood donors. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16(4): 161-2.
- 23- Doyle S, Kerr S, O'Keefe G, O'Carroll D, Daly P, Kilty C. Detection of parvovirus B19 IgM by antibody capture enzyme immunoassay: receiver operating characteristic analysis. *J Virol Methods* 2000; 90(2): 143-52.
- 24- Zaaijier HL, Koppelman MH, Farrington CP. Parvovirus B19 viremia in Dutch blood donors. *Epidemiol Infect* 2004;132(6): 1161-1166.
- 25- Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, Tobler L, Montalvo L, Todd D, et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion* 2007; 47(10): 1756-64.
- 26- Toan N, Song H, Kremsner P, Duy D, Binh V, Duechting A , et al. Co-infection of human B19 in Vietnamese patients with hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2006; 45: 361-9.

Prevalence of parvovirus B19 in blood donors tested by ELISA and PCR

Mahmudi F.¹(MS), Mahmoodian Shooshtari M.²(PhD), Sharifi Z.²(PhD), Hosseini M.¹(PhD)

¹Faculty of Biology Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

²Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human parvovirus B19, a member of the parvoviridae family, with single-stranded DNA is a very minute and non-enveloped virus. Human parvovirus B19 causes a number of clinical illnesses including infectious erythema (fifth disease), hydrops fetalis, transient aplastic crises, arthropathy and congenital aplasia. B19 virus is transmitted via respiratory tract, blood products, and blood transfusion. Parvovirus B19 DNA is detectable through molecular techniques such as PCR. Previous studies indicate that individuals who have anti B19 IgG are negative. IgM antibody against B19 lasts for a few months and IgG antibody persists for many years or lifelong. The aim of this study was to evaluate the prevalence of B19 among blood donors in Tehran.

Materials and Methods

In this cross-sectional study, sera of 730 blood donors who were negative for HIV, HBsAg and HCV were tested for IgG and IgM anti-B19V using ELISA. Then, all of the sera were tested for presence of B19 DNA through semi-nested PCR.

Results

Out of 730 blood donors, 4 (0.5%) had IgM antibody thereby being reported positive; 338 subjects (46.3%) were positive for anti-B19 IgG. DNA B19 was not found in any of the subjects (0%).

Conclusions

Although B19 may cause adverse reactions in some blood recipients, screening blood donors for B19 is not essential. In this study, the high prevalence of IgG on one hand and the lack of any positive cases of B19 DNA on the other indicate of the low risk of the latter to be transfusion transmittable. Further studies on blood donors particularly high risk groups are recommended.

Key words: Parvovirus, Blood donors, Prevalence, PCR

SJIBTO 2008; 5(1): 47-52

Received: 11 Nov 2007

Accepted: 26 Jan 2008

Correspondence: Mahmoodian Shooshtari M., PhD of Virology. Assistant professor of IBTO- Research Center
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599
E-mail: shooshtari@ibto.ir