

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDA
PARVOVİRUS B19 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Şaban GÜMÜŞTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

MERSİN - 2012

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDA PARVOVİRUS B19 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Şaban GÜMÜŞTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBEM TM (ŞG) 2010-5 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 209


MERSİN - 2012


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan
“**Hematolojik Maligniteli Hastalarda Parvovirus B19 Varlığının Araştırılması**”
başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi


31.05.2012


Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman


Doç.Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi


Yrd.Doç.Dr. Seda TEZCAN

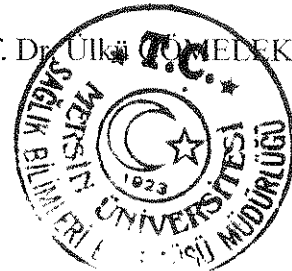
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 31.05.2012 tarih ve 2012/153 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülke ÖMEDEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimize başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ başta olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. E. Naci TİFTİK'e ve kan merkezinde çalışmalarım boyunca bana destek olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim sırasında da beni maddi ve manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Sınıflandırma.....	4
2.3. Parvovirus B19'un Genel Özellikleri.....	5
2.3.1. Morfoloji.....	5
2.3.2. Genomik Yapı ve Organizasyon.....	6
2.3.3. Kapsid ve Kapsid Olmayan Proteinler.....	8
2.3.3.1. Kapsid Proteinleri.....	8
2.3.3.2. Yapısal Olmayan Proteinler.....	9
2.4. Viral Yaşam Döngüsü.....	10
2.5. Kültür.....	14
2.6. Sitopatoloji.....	15
2.7. Patogenez ve İmmünite.....	15
2.8. Epidemiyoloji.....	18
2.8.1. Yaptığı Epidemiler ve Mevsimsel Değişiklikler.....	19
2.8.2. Bulaşma Yolları.....	20
2.9. Klinik Belirtiler.....	20
2.9.1. Asemptomatik İnfeksiyon.....	20
2.9.2. Eritema İnfeksiyozum (Beşinci Hastalık).....	21
2.9.3. Artropati.....	22

2.9.4. Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi.....	23
2.9.5. Geçici Aplastik Kriz (Transiet Aplastik Crisis, TAC).....	24
2.9.6. İmmünokompromize Kişilerde PV-B19 İnfeksiyonu.....	24
2.9.6.1. Hematolojik Malignite ile PV-B19 İnfeksiyonu Arasındaki İlişki.....	25
2.9.7. Gebelik ve PV-B19 İnfeksiyonu.....	28
2.9.7.1. Nonimmün Hidrops Fetalis ve Fetal Ölüm.....	28
2.9.7.2. Konjenital Anemi.....	30
2.9.8. Parvovirus B19 İlişkili Diğer Hastalıklar.....	30
2.10. Laboratuvar Tanısı.....	31
2.10.1. Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Depolanması.....	31
2.10.2. Antikor Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	32
2.10.3. Antijen Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	34
2.10.4. Moleküler Yöntemler.....	36
2.10.4.1. Hibridizasyon Yöntemleri.....	36
2.10.4.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri (NAAT).....	37
2.11. Tedavi.....	40
2.12. Korunma.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Hasta Grubu Kan Örneklerinin Toplanması.....	43
3.2. Kontrol Grubu Kan Örneklerinin Toplanması.....	43
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	44
3.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	44
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	44
3.3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	46
3.3.3.1. DNA Saflaştırılması İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	46
3.3.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	47
3.4. DNA Ekstraksiyonu.....	48
3.4.1. DNA Ekstraksiyonunun Yapılışı.....	48
3.5. Moleküler Analiz.....	49
3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması.....	49
3.5.2. Agaroz Elektroforez İşlemi.....	50
3.5.2.1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	50

3.5.3. Parvovirus B19'un Valığının Tespiti.....	51
3.5.4. İstatiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	64
7. KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Genomik yapı. A: İnsan parvovirus B19 genomunun şematik yapısı. B: PV-B19 genomunun transkripsiyon haritası.....	7
Şekil 2.2. PV-B19'un yaşam döngüsü	11
Şekil 2.3. DNA replikasyonu için model bir virus olan bir dependovirus AAV'un modifiye edilmiş "rolling hairpin" replikasyon modeli.....	13
Şekil 2.4. Sağlıklı kişilerde zamana göre; PV-B19 enfeksiyonuyla ilişkili klinik özellikler, hematolojik değişiklikler, PV-B19 DNA varlığı, PV-B19 serolojisi.....	17
Şekil 2.5. Parvovirus B19 şüpheli kişilerde tanı için algoritma.....	39
Şekil 4.1. PZR yöntemiyle belirlenen PV-B19 DNA'sının, %1,5'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. Hasta grubunda PV-B19 pozitifliğinin aylara göre dağılımı.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Parvovirinae</i> alt ailesine ait taksonomik sınıflandırma ve konakları.....	5
Çizelge 2.2. Farklı risk grubu ve patogenezlerde PV-B19 tedavisi için yaklaşımlar.....	41
Çizelge 3.1. Parvovirus B19'un PZR ile belirlenmesinde kullanılan primerler	49
Çizelge 3.2. Parvovirus B19'un PZR reaksiyon karışımları.....	49
Çizelge 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.....	50
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarındaki PV-B19 pozitifliği ve iki grup arasındaki farklılık.....	53
Çizelge 4.2. Hematolojik maligniteli hasta gruplarında PV-B19 pozitifliği ve prevalansı.....	54
Çizelge 4.3. Kronik lösemili hastalardaki PV-B19 PZR pozitifliğinin, akut lösemili hastalardaki pozitiflik oranları ile karşılaştırılması.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAV	Adeno-associated virus
AIDS	Acquired İmmüno Deficiency Syndrome
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
bç	Baz çifti
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CIE	Counter Immune Electrophoresis (Ters immün elektroforez)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift zincirli DNA
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	Epstein Barr Virus
EIA	Enzyme immünoassay
Eİ	Eritema İnfeksiyozum
ELISA	Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
EM	Elektron mikroskobu
Et-Br	Etidyum Bromid
ETDA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	Food and Drug Administration
HBoV	İnsan Bocavirus
HBV	Hepatit B Virusu
HCV	Hepatit C Virusu
HHV-8	İnsan Herpes Virus-8
HIV	Human İmmündeficiency Virus
HPV	İnsan Papilloma Virus
HTLV-1	İnsan T Hücre Lösemi Virus-1
IFA	İmmun Flourescein Assay
IgA	İmmunoglobulin A
IgE	İmmunoglobulin E

IgG	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
IL	İnter lökin
IEM	İmmünoelektron Mikroskobisi
ISH	İn Situ Hibridizasyon
JMML	Juvenil myelomonositik lösemi
kDA	kiloDalton
KLL	Kronik lenfoblastik lösemi
KML	Kronik miyeloid lösemi
MDS	Myelo displastik sendromu
MM	Multipl Myeloma
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
NIHF	Nonimmün Hidrops Fetalis
NS	Nonstructural=Yapısal Olmayan
ORF	Open Reading Frame=Açık Okuma Bölgesi
PARV4	Parvovirus 4
PLA2	Fosfolipaz A 2
PV	Polisitemia vera
PV-B19	Parvovirus B19
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RHA	Reseptör Bağımlı Hemaglutinasyon
RIA	Radyoimmünoassay
RNA	Ribonükleik Asit
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
TAC	Transient Aplastic Crisis=Geçici Aplastik Kriz
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
THC	T Helper Cell
UV	Ultraviyole
VP1	Viral Protein 1
VP2	Viral Protein 2
VP1u	VP1 Özgül Bölge

ÖZET

Hematolojik Maligniteli Hastalarda Parvovirus B19 Varlığının Araştırılması

Parvovirus B19 (PV-B19), dünyada yaygın olarak görülmektedir ve insidansı 3-4 yılda bir pik yapmaktadır. Çoğunlukla aseptomatik olmakla beraber, eritema infeksiyozum (Eİ), artropati, otoimmün hastalıklarla ilişkili hastalıklar (poliarteritis nodosa, vasküler ve Schönlein-Henoch purpurası gibi), eritrosit üretimi azalmış ya da yıkımı artmış hastalarda geçici aplastik kriz, immün sistemi baskılanmış kişilerde kronik anemi ve sitopeniler, gebelerde nonimmün hidrops fetalis, fetal ölüm ve konjenital anemiye neden olabilmektedir. Aynı zamanda immün sistemi baskılanmış kişilerde P antijeni içeren diğer dokularda meninjit, ensefalit, hepatit, myokardit, nöropatiler, fibromyalji gibi sistemik infeksiyonlara neden olabilmektedir. Hematolojik maligniteli hastaların prognozunda yaptığı sitopeniler nedeniyle büyük etkiler göstermektedir. Bu çalışmada, 2011-2012 yıllarında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Hematoloji Anabilim Dalı Polikliniği'nde klinik tanısı konmuş 100 hematolojik maligniteli hastadan elde edilen plazma örnekleri ve 2011 yılı Haziran-Ağustos ayları arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran, 104 sağlıklı kan bağışçısından elde edilen plazma örnekleri dahil edildi. Elde edilen plazma örneklerinde PV-B19 DNA'sı PZR metoduyla araştırıldı. Çalışılan 100 hasta plazma örneğinin 20 (%20)'sinde ve kontrol grubunun 8 (%7,69)'ünde PV-B19 DNA tespit edildi. Hasta grubu ve kontrol grubu arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu iki grup arasında PV-B19 DNA pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,017$).

Anahtar Kelimeler: Parvovirus B19, Hematolojik Malignite, PZR, Kan Transfüzyonu

ABSTRACT

Investigate The Presence of Parvovirus B19 in Patients with Hematologic Malignity

Parvovirus B19 (PV-B19) is a common virus that is spread worldwide and peak of incidence may rise to every 3 or 4 years. Although PV-B19 infection is often asymptomatic, it cause erythema infectiosum (EI), artropaty, diseases associated with autoimmune disorders (such as polyarteritis nodosa, vasculer and Schonlein-Henoch purpura), transient aplastic crisis in patients with increased red cell turn over, chronic anemia and cytopenias in immunodeficient host, non immune hydrops fetalis, fetal death and congenital anemia. It also may cause other tissues, including of P antigen, systemic infections like meningitis, hepatitis, myocarditis, neuropaty, fibromyalgia. It causes cytopenias because of it affects prognosis of patients with hematologic malignity. In the study; between 2011-2012 years there were 100 plasma samples obtained from Mersin University Health Center of The Department of Hematology, Hematology Clinic and there were 104 plasma samples obtained from healthy blood donors who applied the Mersin University Health Center, Blood Banking Unit. Parvovirus B19 DNA has been investigated by PCR method from the plasma samples. PV-B19 DNA were found in 20 (20%) of studied 100 patients plasma samples and were found in 8 (7,69%) of studied 104 control groups plasma samples. According to data, PV-B19 DNA between patient group and control group was found statistically significant ($p=0,017$).

Key Words: Parvovirus B19, Hematologic Malignity, PCR, Blood Transfusions

1. GİRİŞ

Parvoviruslar, küçük olması nedeniyle latince “parvum” kelimesinden adını alan tek iplikli DNA içeren viruslardır. Bu viruslar, kuşları ve böcekleri de kapsayan hayvanların yaygın infeksiyon ajanıdır. En az dört parvovirus tipinin insanları infekte edebildikleri bilinmekte olup bunlar; dependovirus (Adeno-associated virus 1-5), parvovirus B19 (PV-B19), insan bocavirus (HBoV), insan parvovirus 4 (Parv4)’tür (1, 2).

İlk kez 1975 yılında Cossart ve ark. (3), serum örneklerinde rutin olarak hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) ararken bu virüsü tanımlamışlardır. Cossart ve ark. (3) immün elektroforez yöntemi ile yaptıkları çalışmada birçok serum örneğinde HbsAg pozitifliği bulmasına rağmen hemaglutinasyon ve radyoimmünoassay yöntemleri ile negatif sonuç elde etmişler, elektron mikroskobu (EM) ile yapılan çalışmalarda farklı bir virus tespit etmişlerdir. İlk olarak “serum parvovirus-like particle” ya da insan parvovirus olarak sınıflandırılmasına rağmen 1985 yılında resmi olarak *Parvoviridae* ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmış ve Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından “İnsan Parvovirus B19” olarak isimlendirilmiştir (4).

Parvovirus B19 genellikle replikasyon için mitozun S fazı kuvvetli P antijeni içeren hücrelere ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla mitoz bölünme yeteneği yüksek olan eritroid progenitör hücrelere affinite gösterirler ve litik reaksiyonlara yol açarlar. Aynı zamanda proliferasyona uğrayan P antijeni içeren bazı hücre gruplarını infekte edebilir ve sistemik infeksiyonlara neden olurlar. Dokuların iyileşmesi ile ilgili semptomlar uzun süre devam edebilir (5, 6).

Parvovirus B19 infeksiyonu sonucu oluşan hastalıklar; eritema infeksiyozum (Eİ), artropati, otoimmün hastalıklarla ilişkili hastalıklar (poliarteritis nodosa, vasküler ve Schönlein-Henoch purpurası) (7), eritrosit üretimi azalmış ya da yıkımı artmış hastalarda meydana gelen geçici aplastik kriz, immün sistemi baskılanmış kişilerde meydana gelen kronik anemi, sitopeni (hatta pansitopeni), gebelerde meydana gelen nonimmün hidrops fetalis, fetal ölüm ve konjenital anemi olarak sıralanabilir (8, 9). Aynı zamanda immün sistemi baskılanmış kişilerde P antijeni içeren diğer dokularda

sistemik infeksiyon olarak menenjit, ensefalit, hepatit, miyokardit, nöropatiler ve fibromiyaljiye de neden olabilmektedir (8, 9, 10).

Hematolojik maligniteler için kemoterapi alan çocukların %10'u ve yetişkin hastaların %5 kadarında PV-B19 infeksiyonu aşırı hatta letal sitopenilerle sonuçlanır ve bu hastalar humoral ve/veya hücrel immün yanıt eksikliği nedeniyle virus ile persistant olarak infekt edilirler (9). Hematolojik maligniteli hastaların prognozunda yaptığı sitopeniler nedeniyle büyük etkiler göstermektedir. Klinik olarak yapılan araştırmalarda PV-B19 kaynaklı sitopeniler nedeniyle kemoterapide uzun süreli kesintiler meydana geldiği sonucuna varılmıştır (11). PV-B19 infeksiyonunun erken tanısı bu nedenle oldukça önemlidir (9).

Viral infeksiyonlar ve hematolojik malignite ilk tanı anında, tedavi ve takip sürecinde birlikte görülebilmektedir. Lösemilerde savunma mekanizmasındaki etkilenmenin, viral infeksiyonlara yatkınlığı artırabileceği gibi, viral infeksiyonun lösemiye neden olabileceği düşünülmektedir (12). Buradan hareketle bu çalışmada hematolojik maligniteli hastalarda PV-B19 varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca yetişkin hematolojik maligniteli hasta gruplarında PV-B19 prevalansı ilgili çalışmalar, hematolojik maligniteli çocuk hastalara göre oldukça azdır. Bu nedenle yapacağımız çalışmanın hematolojik maligniteli yetişkin hasta gruplarında PV-B19 prevalansı için önemli veriler sağlaması amaçlanmaktadır. Diğer bir yandan virusun kan transfüzyonu ile bulaşabilmesi nedeniyle kontrol grubu olan kan bağışçılarındaki prevalansının değerlendirilmesi de amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İnsanlarda hastalık oluşturan ilk parvovirus olarak tanımlanan PV-B19'un keşfi 1970'li yıllara dayanmaktadır. İlk kez 1975 yılında Cossart ve ark. (3), kantitatif immünoelektroforez ve radyoimmünoassay ile asemptomatik kan bağışçılarında alınan serum örneklerini hepatit B yüzey antijeni yönünden araştırırken, anormal sonuçlar veren 19 numaralı B panelindeki serum örneğinin elektron mikroskobu (EM) ile incelenmesi sırasında, hayvan parvoviruslarına benzeyen 23 nm çapındaki partüküllerin gözlemlenmesi ile bu virusu tanımlamışlardır. PV-B19 bağımsız olarak 5 yıl sonra Japonya'da "Nakatani" virusu olarak tanımlanmıştır. Fakat daha sonra yapılan testler iki virusun aynı olduğunu kanıtlamıştır (13). Daha sonraki yıllarda DNA ekstraksiyonu ile serbest virionların kapsidi içinde yaklaşık 5.5 kb'lık komplementer tek zincir elde edilmiş ve *Parvovirus* genusunun üyesi olan virusların içerdiği 1.43 g/ml yoğunlukta viral antijenler ile benzer viral proteinler bulunmuştur (14, 15). İlk olarak "serum parvovirus-like particle" ya da "İnsan Parvovirus" olarak sınıflandırılmasına rağmen 1985 yılında resmi olarak *Parvoviridae* ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmış ve Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından "İnsan Parvovirus B19" olarak isimlendirilmiştir (4).

Parvovirus B19, 1980'li yıllarda febril ateşli iki olguda serumda EM ile tespit edilmiştir. 1981'de orak hücre anemili hastalarda geçici aplastik kriz ile ilişkisi gösterilene kadar virüsle bir hastalık arasında belirgin bir bağlantı bulunmamaktaydı (16). İki yıl sonra sağlıklı çocuklarda eritema infeksiyozum ile PV-B19 infeksiyonu seroepidemiolojik olarak ilişkilendirilmiştir (17). Bugün bu hastalıkların etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (9). İlerleyen zamanlarda yetişkinlerde post infeksiyon, simetrik periferik poliartropati ya da artrit ve infekte anneden intrauterin geçiş nedeniyle hamileliğin ikinci üç aylık döneminde fetüsün düşmesi gibi tanımlanmış diğer belirgin sendromlarla PV-B19 infeksiyonunun bağlantısı da belirlenmiştir. PV-B19'un daha sonraları kronik formdayken immünoglobulin ile düzelebilen saf kırmızı hücre aplazisine (red pure cell aplasia) neden olduğu tanımlanmıştır (9, 18).

2.2. Sınıflandırma

Parvovirus B19'un sınıflaması morfolojik ve fonksiyonel özellikleri bakımından *Parvoviridae* ailesinin sınıflamasına uymaktadır. Parvoviruslar yaygın hayvan ve böcek patojenleridir. Sirkovirusların ve TT virusların identifikasyonuna kadar parvoviruslar, memeli hücrelerini infekte eden DNA içeren en küçük viruslar arasında bulunmaktaydı. Bu nedenle ismi latince küçük anlamına gelen “parvum” kelimesinden köken almıştır (1, 8).

Omurgalıları ve omurgasızları infekte etme kabiliyetlerine dayanılarak *Parvoviridae* ailesi sırasıyla *Parvovirinae* ve *Densovirinae* olarak iki alt aileye ayrılır. Etkin bir şekilde replike olabilme kabiliyetlerine, terminal tekrarlarının yapısına, transkripsiyon haritalarına dayanılarak *Parvovirinae* alt ailesi de kendi arasında 5 genusa ayrılmaktadır (19). Bunlar etkin bir şekilde replike olabilmek için eritroid hücreleri tercih eden *Erythrovirus*, etkin bir şekilde replike olabilmek için yardımcı bir virusa (*Adenovirus* gibi) gereksinim duyan *Dependovirus*, otonom olarak her iki şekilde de replike olabilen *Parvovirus*, minklerde replike olabilen *Amdovirus* ve son zamanlarda sığır ve köpeklerin dışında insanları da infekte ettikleri belirlenmiş *Bocavirus* genuslarıdır. Bu genuslar arasında sadece *Erythrovirus* ve *Dependovirus* genuslarının insanları infekte ettikleri düşünülmesine rağmen 2005 yılında İsveçli araştırmacılar tarafından solunum yolu örneklerinde saptanan ve *Bocavirus* genusu içine dahil edilen *Human Bocavirus* ve yine son virus keşifleri ile ilk olarak insan serumunda tanımlanmış henüz sınıflandırılmamış *Human Parvovirus 4*'ün de insanları infekte ettikleri tespit edilmiştir. PV-B19 eritroid prekürsör hücrelerinde etkili bir şekilde replikasyon yapabilme yeteneği nedeniyle şu anda *Erythrovirus* genusunun bir üyesi olarak sınıflandırılmaktadır (1, 5). Çizelge 2.1 yeni keşfedilmiş viruslar ve *Parvovirinae* alt ailesine ait genusları göstermektedir (1, 19).

Çizelge 2.1. *Parvovirinae* alt ailesine ait taksonomik sınıflandırma ve konakları

ALT AİLE	CİNS	VİRUS	KONAK
<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirus</i>	<i>Canine parvovirus-CPV</i>	Köpek, tilkiler
		<i>Mice minute virus-MVM</i>	Mice
		<i>Porcine parvovirus-PPV</i>	Domuzlar
		<i>Feline parvovirus-FPV</i>	Kediler
	<i>Dependovirus</i>	<i>Adeno-associated virus 1-6-AAV</i>	İnsanlar, primatlar
		<i>Avian adeno-associated virus-AAAV</i>	Kuşlar
		<i>Canine adeno-associated virus-CAAV</i>	Köpekler
		<i>Bovine adeno-associated virus-BAAV</i>	Sığırlar
		<i>Duck parvovirus</i>	Ördekler
		<i>Equine adeno-associated virus</i>	Atlar
		<i>Goose parvovirus</i>	Kazlar
		<i>Ovine adeno-associated virus</i>	Koyun
	<i>Erythrovirus</i>	<i>Human parvovirus B19-PV-B19</i>	İnsanlar
		<i>Simian parvovirus-SPV</i>	Primatlar
		<i>Rhesus parvovirus-RhPV</i>	
		<i>Pigtailed macaque parvovirus-PtPV</i>	
	<i>Bocavirus</i>	<i>Bovine bocavirus</i>	Sığırlar
		<i>Canine bocavirus</i>	Köpekler
		<i>Human bocavirus-HBoV</i>	İnsanlar
	<i>Amdovirus</i>	<i>Aleution mink disease virus</i>	Minklerde
<i>Sınıflandırılmamış</i>	<i>Human parvovirus 4-Parv4</i>	İnsanlar	

2.3. Parvovirus B19'un Genel Özellikleri

2.3.1 Morfoloji

Parvovirus B19 virionu ile ilgili önemli veriler elektron mikroskopisi ve X-ray kristalografi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır (20, 21, 22). PV-B19 virionu sadece iki proteinden oluşan kapsid kısmı ve tek zincirli DNA'dan oluşan basit bir yapıya sahiptir. Zarfsız viral partiküller yaklaşık 22-26 nm arası çaptadır ve ikozahedral simetri gösterirler. İkozahedral simetriyi kapsid yapısındaki majör kapsid proteini olan VP2 oluşturmaktadır. X-ray kristalografi teknolojisi ile yaklaşık 3,5 Å rezolüsyonda rekombinant PV-B19 benzeri partikülün yapısı üzerinde yapılan araştırmaya göre diğer ikozahedral viruslardakine benzer olarak majör VP2 kapsid proteini, jel kıvamında bir

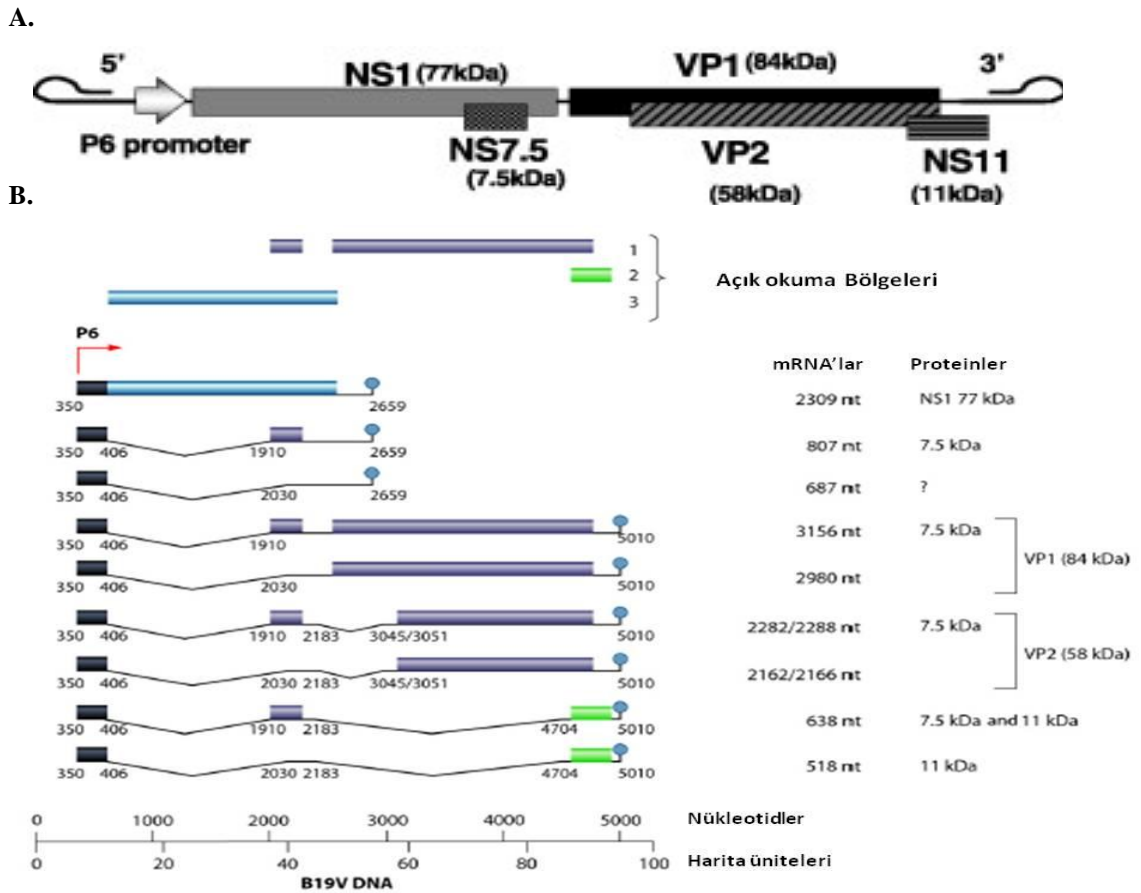
ruloya benzemektedir (22). Çoğunlukla hem dolu hem boş kapsidler negatif boyama ile elektron mikroskopisi ile gözlemlenebilmektedir (8). X ışını kristalografi çalışmaları, aynı zamanda PV-B19'un dış yüzey yapısının, diğer parvoviruslardan belirgin çıkıntılar taşımaması ile farklılık gösterdiğini de ortaya koymaktadır (22). Virion, kapsomerin 60 kopyasının birleşmesiyle oluşturulmuştur ve tek zincirli DNA burada paketlenmiştir. Sınırlı DNA içeriği ve lipid bir zarfın yokluğu PV-B19'u, fiziksel (ısı, solvent ve deterjanlar gibi) inaktivasyona oldukça dirençli kılmaktadır. Virus 56 °C'de 60 dakika stabildir ve lipid çözücüler etki göstermediğinden virus inaktivasyonunda başarısızdır (8, 23).

2.3.2. Genomik Yapı ve Organizasyon

Tek zincirli yaklaşık 5596 nükleotidlik genom, yaklaşık 383 nükleotidlik dizisinin her iki yönde terminal tekrarı ile onun yanındaki internal kodlanan 4830 nükleotid dizisinin birleşmesiyle oluşmaktadır. Terminal diziler palindromiktir ve komplementer zincirin oluşumunda önemli bir rol aldığı varsayılan çift katlı (duplex) konfigürasyonlu hairpin (saç tokası) formunu alabilmektedirler. Hayvan parvoviruslarının çoğunda olduğu gibi PV-B19 genomu da iki majör iki minör açık okuma bölgesi (open reading frame, ORF)'ne sahiptir. Majör sol uç (5' ucu) tarafındaki ORF'nin ifade edilmesi ile yapısal olmayan erken viral proteinlerden 77 kDa'luk NS1 oluşturulurken, majör sağ uç (3' ucu) tarafındaki ORF'nden ise replikasyonun geç dönemlerinde ifade edilen yapısal 84 kDa'luk VP1, 58 kDa'luk VP2 viral kapsid proteinleri oluşturulur. İki minör ORF'nin biri majör ORF'lerinin merkezinde, diğeri ise majör sağ uç ORF'nin sonundadır ve majör ORF'leri ile üst üste çakışık halde bulunmaktadır. Bu bölgelerden sırasıyla varsayımlara dayalı olarak 9 kDa'luk ve 11 kDa'luk iki protein sentezlenir. Bunlara ek olarak 7,5 kDa'luk proteini kodlayan bir ORF'nin varlığı da bilinmektedir (Şekil 2.1) (5, 24, 25, 26).

Viral transkripsiyon, genomun 5' ucunda yerleşen B19 p6 promotorundan başlatılır ve 9-11 adet üst üste çakışan RNA transkripti meydana gelir. Bunun dışında genomun çeşitli bölgelerinde diğeri promotorlar (B19 p44) tanımlanmış olmasına karşın bunlar doğal infeksiyon sırasında aktif değildir. Diğeri parvovirusların transkripsiyon

şemasından farklı olarak PV-B19'un yapısal olmayan proteinin ifadesi için ORF'inden başlayan transkripsiyon, genel poliadenilasyon sinyaline dek sürdürülmek yerine genomun orta bölümlerinde son bulur ve farklı bir poliadenilasyon sinyali kullanılır. PV-B19'un transkripsiyon stratejisindeki farklılıkların, replikasyon sırasında transkripsiyonun kontrolünün promotor etkisinden çok birleştirme (splicing), terminasyon ve poliadenilasyon aşamalarında olduğu düşünülmektedir (8, 24, 27).



Şekil 2.1. Genomik yapı. **A:** İnsan parvovirus B19 genomunun şematik yapısı (26). **B:** PV-B19 genomunun transkripsiyon haritası, 9 ana transkrip ve bunlardan sentezlenen proteinler gösterilmiştir (24).

Filogenetik analiz metodları günümüzdeki halini alana kadar çeşitli PV-B19 izolatlarında genom analizi çalışmaları nükleotid dizi farklılıklarının genel olarak düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. Farklı kaynak ve bölgelerden elde edilen virüsler

PZR ürünlerinin restriksiyon enzim analizi, tek zincir komformasyonel polimorfizm analizi ve çoklu hizalama ile sekanslama yöntemleri kullanılarak filogenetik olarak yakın bulunmuştur. Bu izolatlar arasında en fazla %6 dizi farklılığı gösterilmiştir. Genomun en iyi korunan bölgesi NS1 bölgesidir. VP1 ve VP2'yi eksprese eden bölge dizilerinde % 2-3 farklılık izlenebilmektedir (8, 28).

Son yıllarda standart izolatlardan önemli derecede genetik farklılık taşıyan bazı viral varyantlar tanımlanmıştır. Bunlardan ilki geçici aplastik anemili Fransız bir çocuktan izole edilen V9 varyantıdır. Daha sonra yapılan çalışmalarla bu varyantı, HIV pozitif kronik anemili bir olgudan izole edilen A6 ve deri örneklerinden izole edilen LaLi ve HaAM izolatları izlemiştir. Tüm varyant virusların değerlendirildiği filogenetik analizler, günümüzde tanımlanan parvovirus izolatlarının birbirlerinden yaklaşık % 10 genetik farklılık gösteren 3 genotip olarak dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Şu ana kadar önerilen sınıflamalarda standart PV-B19 izolatları "pvbaaa" Genotip 1'i, birbirleri arasında önemli düzeyde genetik yakınlık gösteren LaLi, A6 ve HaAM izolatları Genotip 2'yi, V9 izolatı Genotip 3a ve D91.1 izolatı ise Genotip 3b'yi teşkil etmektedir (24, 28). Viral varyantların klinik ile ilişkisi bulunamamıştır. Antijenik düzeyde genotipler arasında önemli benzerlikler bulunmaktadır. Bu nedenle rekombinant antijenlerle yapılan serolojik testlerde güçlü çapraz reaksiyonlar gözlemlenmiştir. İngiltere ve diğer bazı batı ülkelerinde yapılan geniş seroprevalans çalışmaları, saptanan izolatların büyük çoğunluğunu Genotip 1 (standart parvovirus B19)'in oluşturduğunu ortaya koymuştur (28, 29).

2.3.3. Kapsid ve Yapısal Olmayan Proteinler

2.3.3.1. Kapsid Proteinleri

Parvovirus B19 kapsidi, üst üste çakışan okuma bölgeleri ile kodlanan VP1 ve VP2 olarak adlandırılan iki kapsomer proteininin birleşimidir. Her kapsid toplamda 60 kapsomerin ikozahedral yapı oluşturmasıyla meydana gelir. VP2 majör yapısal proteindir ve toplam kapsid proteinlerinin %96'sını oluşturur. VP2 proteini 3125-4786 arası nükleotid dizisi tarafından kodlanır ve moleküler kütlesi 58 kDa'dur (8). X-ray

kristalografi teknolojisi ile yapılan çalışmalara göre ikozahedral viruslardakine benzer olarak majör VP2 kapsid proteini jel kıvamında bir rulo benzemektedir. Bu nedenle kapside ikozahedral simetri yapısını kazandıran proteinin VP2 proteini olduğu düşünülmektedir (22). VP2 proteinleri viral bağlanma proteini olarak PV-B19'un konak hücre reseptörü olan kan grubu P antijenlerine doğrudan bağlanabilmektedir (24, 27).

Minör kapsid proteini VP1 2444-4786 arası nükleotid dizisi tarafından kodlanır ve toplam viral kapsid proteinlerinin %4'ünü oluşturmaktadır. Moleküler kütlesi 84 kDa'dur. VP1 ve VP2 kapsid proteinleri aynı ORF'den köken alır ve VP2 proteininin amino ucuna 227 aminoasitin eklenmesiyle VP1 ile VP2 özdeş olmaktadır (5, 8). Yapısal olarak VP1'in bu kendine özgü bölgesi (VP1u) virion kapsidinin dış bölgesine yerleşmiştir ve çoğu lineer yapıda olan çok sayıda nötralizan epitop içerir. Tam tersine VP2'nin nötralizan epitoplarının çoğu konformasyondur (5). VP1 ve VP2 kapsid proteinleri bakteri, böcek ve memeli hücrelerinde sentezlenebilirler. Bu canlı gruplarında bu kapsid proteinleri, doğal virionlara fiziksel, antijenik ve immünolojik benzer olabilecek şekilde ifade edilebilirler (8). VP1 proteini kapsid formasyonunun oluşumundan çok fosfolipaz A₂ (PLA 2) benzeri aktivitesi ile virusun hücreye girişinde önemli rol oynamaktadır (24).

2.3.3.2 Yapısal Olmayan Proteinler

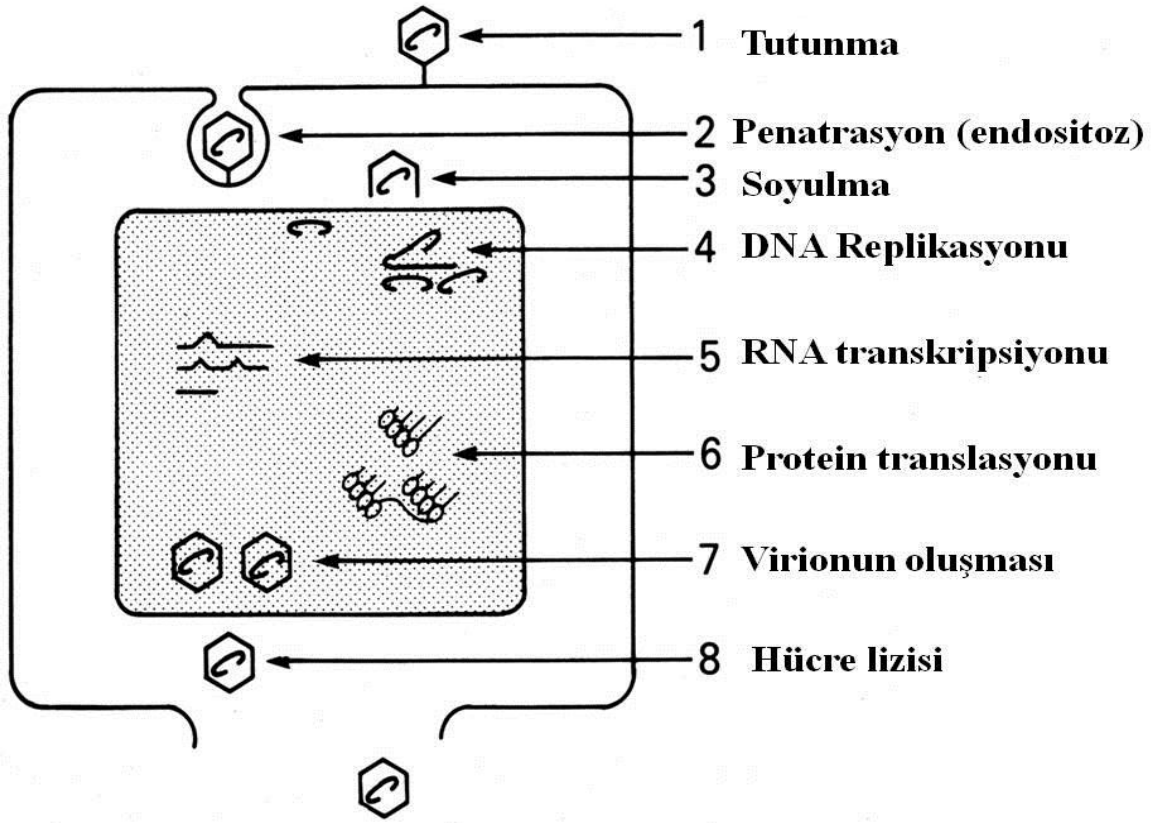
Günümüze kadar birkaç yapısal olmayan protein tanımlanmıştır. Majör yapısal olmayan protein "NS1" 435-2448 arası nükleotid dizisi tarafından kodlanır ve 77 kDa moleküler kütleye sahiptir (8). NS1'in fonksiyonu tamamen karakterize edilmemesine rağmen diğer parvovirus verilerine dayanılarak spesifik DNA bağlanma bölgesine tutunma, DNA sentezinin yürütmesi, ATPaz ve helikaz aktivitesi gibi görevlerinin olduğu düşünülmektedir (5, 8, 24). Bu nedenle NS1'in, B19 p6 promotörüne bağlanarak viral transkripsiyonun regülasyonu ve viral DNA replikasyonunda önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Ayrıca NS1'in indüklenmiş hücre ölümü aktivasyonu için, anahtar kilit ilişkisi gibi rol alarak kaspaz 3 içeren bir yol ile apoptozise neden olabileceği ve sitotoksinite ile arasındaki yakın ilişki gösterilmiştir. Aynı zamanda sitokin uyarılımı ile apoptozisi başlatabileceği düşünülmektedir (5, 8). NS1 bu biyolojik fonksiyonlarının

çeşitliliği için temelde iyi korunmuş nükleozid trifosfat bağlanma motiflerini içerir. Bu domainde tek aminoasit mutasyonu oluşursa sitotoksisite kaybolmaktadır. Ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde NS1 proteinlerinin ifadesi, NS1'in immünolojik özellikleri ve fonksiyonu çalışmaları için bir fırsat sağlayabilir (8).

NS1 proteinin ifade edilmesine ek olarak genomun sol kısmında ve sağ kısmında başka açık okuma bölgeleri keşfedilmiştir. Fakat bu bölgelerden ifade edilen protein türevlerinin rolleri bilinmemektedir. 500-600 nükleotidli bu en küçük RNA'lar PV-B19 ile infekte lösemili insan kemik iliği hücrelerinde en az iki protein oluştururlar (8). Majör sol uç ORF'nin ifade edilmesi ile yapısal olmayan erken viral proteinlerden 77 kDa'luk NS1 oluşturulurken, majör ORF'leri ile üst üste çakışık diğer minör ORF'lerinden ise 7,5 kDa'luk, 11 kDa'luk ve 9 kDa'luk diğer yapısal olmayan proteinler oluşturulur (25, 26). Prolince zengin motifler içeren 11 kDa'luk proteinin, ökaryotik hücre içi sinyal iletimi proteinlerinde yer alan SH3 bağlama bölgesine benzerlik gösterdiği ve virion infektivitesi için gerekli olduğu düşünülmeye rağmen, diğer proteinlerin yapı ve fonksiyonları henüz net olarak açıklanamamıştır (27).

2.4. Viral Yaşam Döngüsü

Parvovirus B19'un yaşam döngüsü diğer zarfsız DNA viruslarının yaşam döngüsüne benzemektedir; replikasyon, konak hücre reseptörlerine virusun bağlanması, hücre içine girişi, konak hücre nükleusuna viral genomun translokasyonu, DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu, kapsidlerin birleşmesi, genomun paketlenmesi ve son olarak olgun virionun serbest kalabilmesi için hücreyi lizize uğratması gibi aşamaları içermektedir (Şekil 2.2) (8).



Şekil 2.2. PV-B19'un yaşam döngüsü (8).

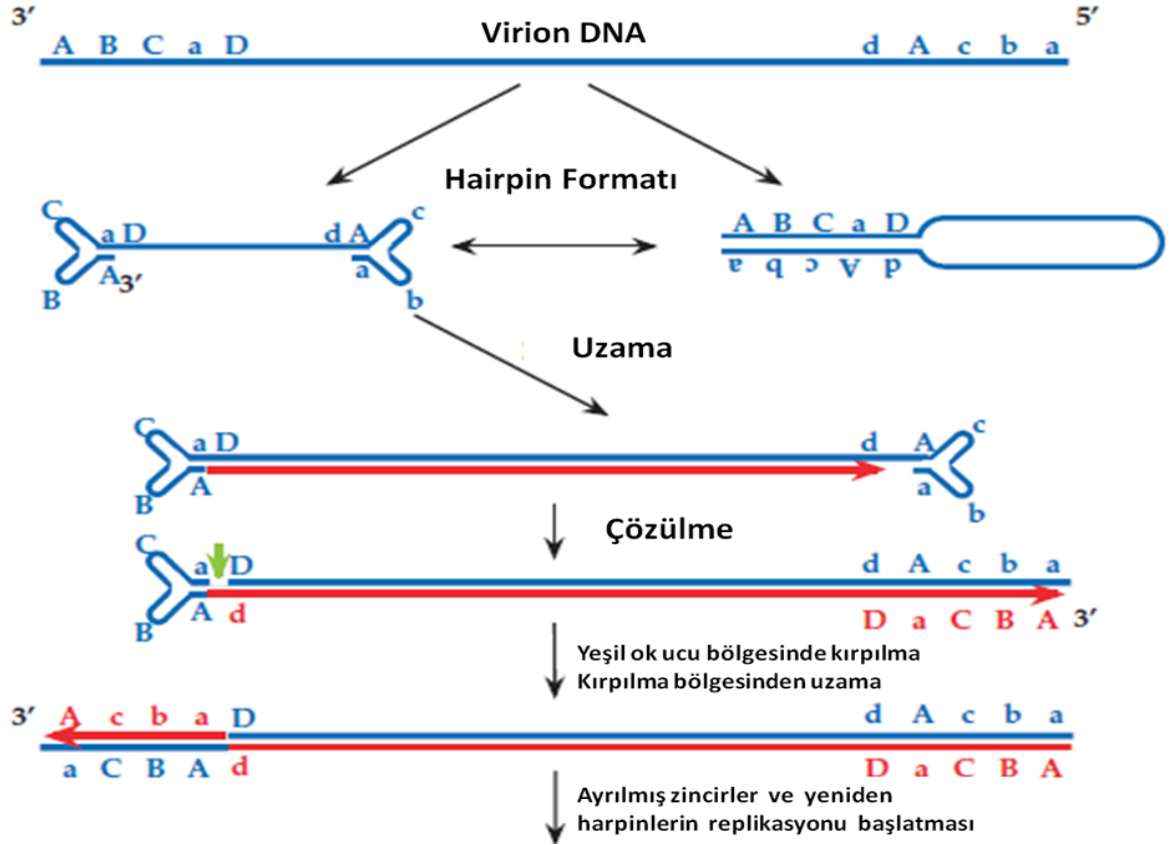
Parvovirus B19 başlangıçta aglütine insan kırmızı hücrelerinde gösterilmiştir ve eritroid progenitör hücrelerde aynı aglütininin konak hücre reseptörü olarak rol oynayabileceği hipotezi kurulmuştur. Böylece bir belirteç olarak hemagglütinasyonun kullanımı ile hemagglütinin olarak aynı zamanda kan P grup antijeni olarak da bilinen glikolipid globosid tanımlanmıştır. PV-B19 için bu antijen bir konak reseptörü görevi görerek virusun hücreye tutunmasını sağlar. P antijeni, PV-B19 konak reseptörü olduğundan ya P antijeni ya da monoklonal anti-P antikorlarının doku kültürüne eklenmesi eritroid progenitör hücreleri PV-B19 infeksiyonundan koruyabilmektedir. Ayrıca genetik olarak P antijeni eksikliği olan kişiler doğal olarak PV-B19 infeksiyonuna dirençlidirler (8).

P antijeni, megakaryositler, endotelial hücreler, fetal miyositler, karaciğer hücreleri, böbrek hücreleri, kardiyak miyositler ve eklem sıvısında da gösterilmiştir. Buna rağmen bu hücre tipleri PV-B19 infeksiyonuna açık (permissiv) değildir.

İnfeksiyonuna açık ve infeksiyonuna açık olmayan (nonpermissiv) hücrelerde bu durumu konu alan ve PV-B19 genomu içeren plazmidler ile yapılan birçok transfeksiyon çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalarda ilk dönemlerde PV-B19 infeksiyonuna açık olmayan hücrelerde sitotoksik NS1'in ifade edilmesinde tam uzunluktaki transkripsiyon ürünlerindeki bir engelin olabileceği öngörülmekteydi. Fakat kapsid transkriptleri üretimi de görülmemektedir. Alternatif olarak yapılan daha sonraki çalışmalarda, konak hücreye girişte görev alan, henüz tanımlanmamış bir ko-reseptörün olabileceği düşünülmüştür (5, 8). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda P antijeninden başka konak hücreye girişte görev alan $\alpha 5\beta 1$ integrin ve Ku80 DNA bağlama proteini gibi ko-reseptörlerin gerekliliği belirlenmiştir (24). İnfeksiyona açık eritroid progenitör hücreler yüksek düzeyde globosid ve $\alpha 5\beta 1$ integrinleri sentez eder fakat infeksiyona açık olmayan olgun eritrosit hücreleri sadece globosid içerirken, $\alpha 5\beta 1$ integrinler ve nükleus bulunmaz (5). Sonuç olarak globosid PV-B19 infeksiyonu için gerekli olmakla birlikte hücrenin PV-B19 infeksiyonuna açık olması için yeterli değildir. Buna rağmen PV-B19 infeksiyonuna açık olmayan hücre tiplerinde globosid sentez edilmesi, başta miyokardit olmak üzere eritema infeksiyozumun kızarıklığı ve transplental infeksiyona aracılık etmektedir (8). PV-B19 infektivitesi için gerekli diğer bir anahtar molekül fosfolipaz A₂'dir ve bu özellik VP1'in kendine özgü bölgesi (VP1u)'nde bulunur. Fosfolipaz A₂ fosfolipidleri araşidonik aside parçalar ve araşidonik asitten enflamatuvar olaylarda önemli rol oynayan prostoglandin ve lökotrienler sentezlenir (5).

Parvoviruslar dinlenme evresindeki hücreleri viral genomun replikasyonu için aktive edemezler. Bu nedenle parvoviruslar replikasyon için hücresel işlevleri aktif olan hücrelere gereksinim duymaktadır. Viral genomun replikasyonu nükleusta gerçekleşir ve konak hücrenin S evresinde bulunması gereklidir. S fazı hücresel olayların aktif olduğu evredir. Virionun içinde enzim bulunmamaktadır (30). DNA'nın replikasyonunda ve mRNA'ların transkripsiyonunda konak hücre DNA ve RNA polimerazları etkilidir ancak virusun NS proteinlerinin varlığı da gereklidir. Otonom viruslar olarak parvoviruslar replikasyon sırasında DNA polimeraz α ve γ 'yı içeren hücresel DNA polimerazları ve yardımcı proteinleri kullanırlar. Bu yardımcı proteinlerin aktiviteleri DNA'nın spesifik bir bölgesine bağlanma aktivitesi, DNA'nın belirli bir bölgesine nükleaz aktivitesi ve helikaz aktivitesidir. Parvovirus replikasyonu ile ilgili yapılan birçok çalışma adeno-associated virus (AAV) üzerinedir. (31, 32).

Favori model NS proteinlerinin endonükleaz aktivitesi ile yuvarlanan hairpinlerin çözülmesidir (Şekil 2.3) (32).



Şekil 2.3. DNA replikasyonu için model bir virus olan bir dependovirus AAV'un modifiye edilmiş "rolling hairpin" replikasyon modeli (32).

S fazındaki hücrelerde virus, viral tek zincirli DNA (ssDNA)'dan çift zincirli DNA (dsDNA) oluşturabilmek için hücresel DNA polimerazı kullanır. dsDNA açık okuma bölgelerinden viral mRNA'lar hücresel RNA polimeraz II yardımıyla oluşturulur. Yapısal olmayan proteinler genomun sol tarafından, yapısal kapsid proteinleri ise genomun sağ tarafından kodlanır. Oluşan NS1 viral genomun replikasyonunda DNA sentezinin yürümesi için promoterleri transaktive eder. Pozitif polariteli viral genomun 3' terminal kısmındaki palindromik diziler primer görevi alarak replikasyonu başlatırlar ve iki sarmallı replikatif ara ürün oluşturulur. Bu iki sarmallı

replikatif formdan ise hairpin yapıların primer görevi görmesiyle negatif polariteli DNA sarmalı üretilir. Kapsid proteinleri ile tek zincirli DNA birleşerek virion oluşturulur. Virion konak hücreyi NS1'in sitotoksik etkisiyle lizise uğratarak serbest hale gelir. Serbest olgun virionlar daha sonra tekrar P antijeni bulunduran S fazındaki yeni hücreleri infekte ederler (33).

2.5. Kültür

Parvovirus B19'un üretilmesi için hayvan modeli yoktur ve yalnızca birkaç farklı kültürde üretilirler. Eksplante insan kemik iliği kültürlerinde *in vitro* PV-B19 çalışmaları, virusun eritroid spesifitesini doğrulamaktadır. Pluripotent kök hücreler birlikte bulundurulduğunda PV-B19 enfeksiyonu için eritroid progenitör hücrelerin duyarlılığı artmaktadır. PV-B19; insan kemik iliği, fetal karaciğer, umbilikal kan ve periferik kan içeren kaynakların herhangi birinden gelen eritroid progenitör hücrelerde üretilirler (5). Muhtemelen eritroid progenitör hücrelerinin hızlı bölünmesini desteklemesi nedeniyle PV-B19 replikasyonunun devam ettirilmesi için tüm kültür sistemleri eritropoietin gerektirir. Tüm sistemler kültür eksplantıdır ve uzun dönemli kültürler için uygun değildir. Ancak PV-B19 aynı zamanda birkaç spesifize edilmiş hücre dizilerinde de üretilirler. Bunlar iki megakaryosit hücre dizisi, MB-02 ve UT-7/Epo ve iki eritroid lösemi hücre dizisi JK-1 ve KU812Ep6'dır. Bu hücre dizileri replikasyon mekanizmaları, nötralizasyon oluşturma ve infektivite deneyleri için kullanılmaktadır. Buna rağmen bu kültürlerden virusun elde edilmesi oldukça zayıftır ve bu kültürler tanı testleri için elde edilecek antijenin bir kaynağı olarak kullanılamazlar (5).

Parvovirus B19 enfeksiyonunun incelenebileceği bir hayvan modeli bulunmamaktadır. Ancak Aleutian Hastalığı'nın etkeni olan "Aleutian Mink Disease Parvovirus" enfeksiyon modelleri PV-B19 enfeksiyonu ile benzer özellikler taşıdığı için, PV-B19 patogenezi de alternatif olarak ışık tutabilir (34). Aynı zamanda "Simian Parvovirus"un *Cynomolgus* maymunlarında anemi ve hidrops fetalis etkeni olması, bu enfeksiyon modelinin de PV-B19 enfeksiyonunun fizyopatoloji ve tedavi yaklaşımlarında yararlı olacağı kanısını doğurmaktadır (35).

2.6. Sitopatoloji

Hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda PV-B19 ile infekte eritroid progenitör hücrelerin sitopatik etkisi, ilk olarak 1948’de geçici aplastik krizli hastaların kemik iliğinde tanımlanan, alternatif olarak fener hücreleri de denen dev pronormoblastlar ile gösterilmiştir. Dev pronormoblastlar 25-32 nm arası çaptaki erken eritroid hücrelerdir. Geniş eozinofilik nükleer inklüzyon yapıları, sitoplazmik vakuolizasyon ve arasıra da “dogear (kıvrımlı köşe)” çıkıntıları gözlemlenebilir. Hücrelerin elektron mikroskopisi ile incelenmesinde; marjine kromatin, nükleustaki virus partikülleri, yalancı ayak formasyonunu içeren birden fazla sitopatik yapısal değişiklikler göz önüne çıkmaktadır (5).

2.7. Patogenezi ve İmmünite

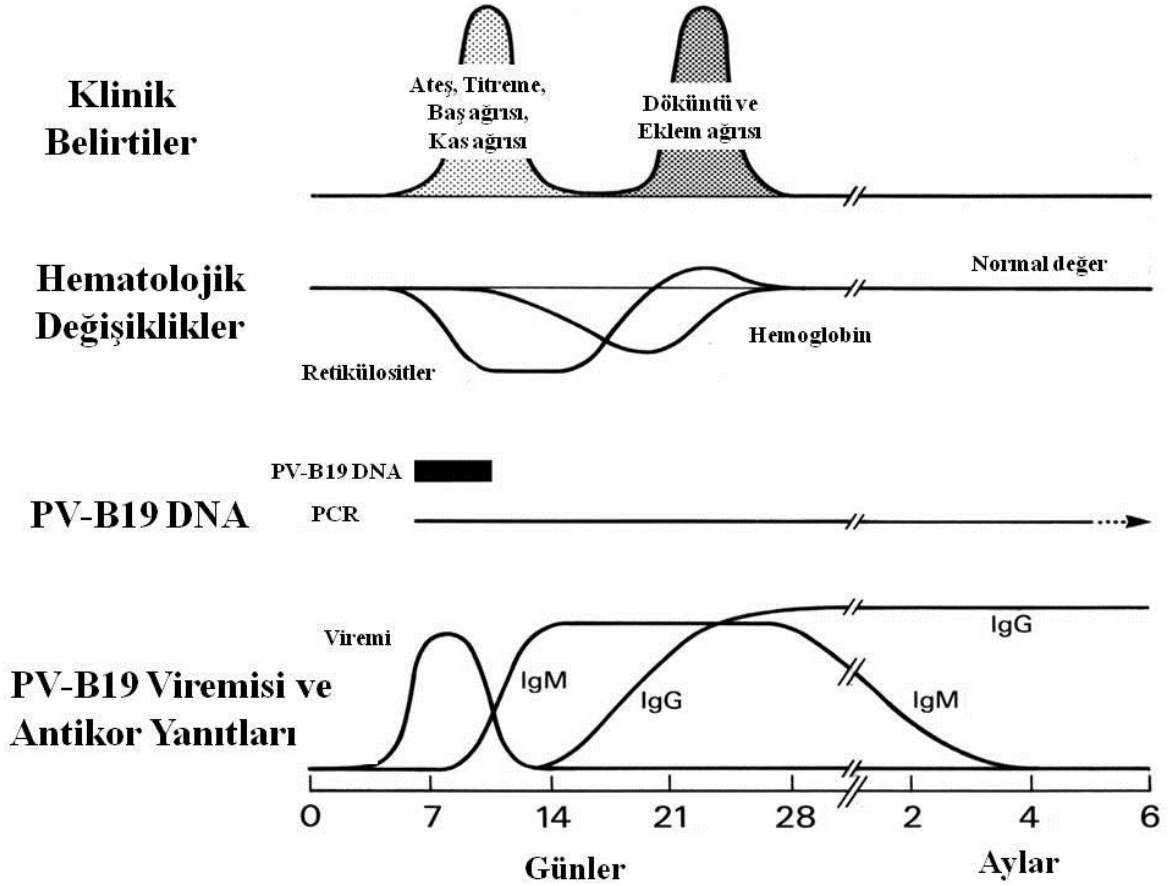
Parvovirus B19’un patogenezi ile ilgili bilgiler, İngiltere’de immün sistemi sağlıklı yetişkin gönüllülerde yapılan iki çalışmaya dayanmaktadır. İnfekte edilen bu gönüllü bireylerde infeksiyon bifazik ilerlemiştir. Nonspesifik faz olarak da bilinen ilk fazda, intranasal olarak virusa maruz kaldıktan bir hafta sonra bu infekte kişilerde yaklaşık bir hafta süren yoğun viremi gelişmiştir. Virusun kan konsantrasyonu yaklaşık 10^{11} - 10^{14} virus partikülü/ml düzeyine ulaştıktan sonra, bu yüksek titreyle birlikte ateş, halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, kaşıntı, boğaz ağrısı gibi prodromal belirtiler ortaya çıkmıştır (36, 37). Bu viremik süreçte virus, oral ve solunum yolu sekresyonlarına geçer ve solunum yolu belirtilerinin ortaya çıkması virusun bu bölgede replike olduğunu işaret etmektedir (5, 6). Viremi sırasında virus kemik iliğindeki eritroid progenitör hücrelerde litik infeksiyona neden olur. Kemik iliğinde eritroid progenitör hücreler neredeyse kaybolur ve eritropoezis ortalama 5 gün durur (6). Yaklaşık olarak infeksiyonun 10. gününde periferik yaymada retikülositlerin kaybolduğu, hemoglobinde ve beraberinde nötrofil, lenfosit, trombosit sayısında hafif düşme olduğu gözlemlenir (37). Hematolojik olarak normal hastalarda bu durum klinik olarak belirtisizdir ve sadece hemoglobinde hafif düşüş gözlemlenir. Fakat kronik anemili hastalarda, eritrosit ömrü daha düşük

olduğu için derin bir lenfositopeni ve hemoglobin konsantrasyonunun çok düşük düzeylere inmesi, geçici aplastik krize neden olmaktadır (6).

Parvovirus B19 infeksiyonuna karşı gelişen immün cevap büyük oranda humoraldır. Vireminin son günlerine doğru yaklaşık 10. günden itibaren serumda immünoglobulin M (IgM) saptanabilir. İyileşme dönemi yaklaşık olarak infeksiyondan 10 gün sonra görülen IgM tipi antikorların oluşmasıyla başlar ve yaklaşık olarak bir hafta sonra immünoglobulin G (IgG) tipi antikorlar oluşur. Antikorlar nötralizan etki gösterir (5, 6). Genelde hastalığın ilk fazının iyileşme göstermesi, vireminin kaybolması, dolayısı ile aneminin düzelmesi, virus spesifik IgM ve IgG saptanması ile korelasyon gösterir (5). IgM antikor cevabı 2-3 ayla sınırlıyken, oluşan IgG cevabı ise yıllarca hatta yaşam boyu sürebilir (6). Egemen olan humoral immün yanıt majör kapsid proteini olan VP2'ye karşıdır, konvalesan dönemde minör kapsid proteini olan VP1'e karşı da oluşur. İnfekte bireylerin yaklaşık %90'ında immünoglobulin A (IgA) antikorları saptanır ve nazofarengeal yolla infeksiyona karşı korunmada rol oynayabilir (38). NS1 antikorlarının araştırıldığı son çalışmalarda artritli hastalarda NS1'e karşı antikorlar gözlemlenmiş, komplikasyon görülmeyen hastalarda NS1'e karşı antikorlar tespit edilmemiştir (6). Son alışmalar kapsid proteinlerinin Sınıf II molekülleri ile CD4 T hücrelerine sunulması ile virusa karşı klasik Th1 yanıtının oluşabileceğini göstermektedir. PV-B19 için hücreyel yanıtın gösterilmesi humoral yanıtı göre oldukça zordur. Bu nedenle hala çalışmalar devam etmektedir (8). Antikor üretiminin başlamasıyla kanda retikülositler tekrar görülür ve hemoglobin normal değerine erişir. Ancak immün yetmezliği olan hastalarda ise yetersiz antikor cevabı olabileceğinden persistan infeksiyon, kronik kemik iliği supresyonu ve kronik anemiye neden olabilmektedir (6).

Hastalığın spesifik faz olarak da bilinen ikinci fazı, infeksiyonun yaklaşık 17. gününde başlar ve iki üç gün süren eritematöz döküntü görülür. Döküntü sonrasında da el eklemleri, diz, ayak bileğinde hafif şişlik ve sertlikle karakterize artrit klinik tabloya eşlik eder (37). İkinci fazda görülen bu döküntü ve artropati vireminin kaybolduğu ve immün cevabın görüldüğu dönemde ortaya çıktığından bu semptomların gelişmesinde virus ve antikorlardan oluşan immünkomplekslerin aracı olduğu düşünülür ve hastalarda bu dönemde virus bulaşı gözlemlenmez. Döküntü görülmeyen hastalarda ise artropati gözlemlenebilmektedir (6). Sağlıklı kişilerde zamana göre; PV-B19 infeksiyonuyla

ilişkili klinik özellikler, hematolojik değişiklikler, PV-B19 DNA varlığı, PV-B19 serolojisi gibi değerler Şekil 2.4’de gösterilmiştir (8).



Şekil 2.4. Sağlıklı kişilerde zamana göre; PV-B19 enfeksiyonuyla ilişkili klinik özellikler, hematolojik değişiklikler, PV-B19 DNA varlığı, PV-B19 serolojisi (8).

Parvovirus B19’a bağlı hidrops fetalsinin patogenezi tam aydınlatılamamıştır. PV-B19 plasentadan fetüse geçebilmektedir. Fetüsün PV-B19 enfeksiyonuna duyarlılığı eritrosit ömrünün kısa oluşu (45-70 gün) ve eritropoezisin artmış olması, böylece fazla sayıda eritroid progenitör hücrelerin bulunması ile açıklanacağı gibi, eritroid progenitör hücrelerinin ana kaynağının fetüste karaciğer olması nedeniyle çok aktif olan bu karaciğer hücrelerinin PV-B19’un reseptörü olan P antijeni bulundurması da patogenezi de rol alabilir. Bu durum PV-B19 enfeksiyonu için optimum şartları sağlar.

Aynı zamanda fetüsün immünitesi olgunlaşmamış olduğundan immün yanıt oluşmaz. Fetüste infeksiyon öncelikle eritroid progenitör hücrelerin bulunduğu karaciğerde gerçekleşir. Fetal eritroid progenitör hücrelerin litik infeksiyonu hemoglobin konsantrasyonunda düşüğe neden olur. İmmün yanıtın etkin bir şekilde oluşmaması nedeniyle gelişen derin anemi; hipoksemi ile birlikte konjestif kalp yetmezliği, yaygın ödem, fetal hidrops ve ölüme yol açar. Fetüsün immünitesinin olgunmamış olması nedeniyle PV-B19 infeksiyonu kronik bir hal alarak P antijeni taşıyan başta miyokardiyal hücreler olmak üzere, fetal böbrek hücreleri, vasküler endotelial hücreler gibi diğer organlardaki hücreleri de infekte ederek çoklu organ tutulumuna da neden olabilmektedirler. Bu nedenle plasenta villusları içinde vaskülit, fetal miyokardit gibi olgular gözlemlenmektedir (6, 38).

2.8. Epidemiyoloji

Parvovirus B19 infeksiyonu tüm dünyada yaygın bir insan patojenidir. En sık okul çağı çocuklarında (5-15 yaş) görülse de tüm yaşlarda infeksiyon görülebilir. IgG antikorlarının prevalansı, 1-5 yaş arası çocuklarda %37, 6-19 yaş arası çocuklarda %15-60 arası, yetişkinlerde %30-60 arası, daha yaşlı popülasyonda ise %85 ve daha yüksek değerlerdedir. Ülkemizde 2009 yılında Konya bölgesinde Türk Dağı ve ark. (39) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli yaş gruplarında PV-B19 seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan 631 yetişkin birey (18 ve >60 yaş aralığında) kan bağışçısından; 542 çocuk (0-17 yaş) ise çeşitli sağlık kurumlarına herhangi bir sebeple başvuran çocuklardan rastgele seçilmiştir. Çalışma gruplarına ait serum örneklerinde PV-B19 spesifik IgG antikorları araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 1173 kişiden 339 (%28,9)'unda PV-B19 spesifik IgG antikorları saptandığı belirtilmiştir. PV-B19 IgG antikor pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı; 0-4 yaş grubunda %15,8; 5-9 yaş grubunda %16; 10-14 yaş grubunda %24,2; 15-19 yaşları arasında %40,9; 20-29 yaş grubunda %34,7; 30-39 yaşları arasında %35,5; 40-49 yaş grubunda %32,2; 50-59 yaş grubunda %37,5 ve 60 yaş üzerinde %53,8 seropozitiflik saptandığı belirtilmiştir.

Üreme çağında olan kadınların %50-60'ında dolaşımında IgG bulunmaktadır ve yıllık serokonversiyon %1,5 oranını göstermektedir (5, 8). Genel popülasyonda antikor hüküm sürüyor olmasına rağmen viremi ya da viral DNA'nın gösterilmesi nadirdir (8). PV-B19 viremisinin gönüllü kan bağışçılarında, prevalansı 1/1000–1/7000 oranları arasında, viral titresi 10^2 - 10^{12} GE/ml arasında ve plazma havuzlarındaki hesaplanmış titre 0 - 10^9 GE/ml arasındadır (41). PV-B19 serolojisi ve viremiyle ilgili birçok çalışmanın aksine sağlıklı kişilerin kemik iliğinde PV-B19 DNA'sının varlığıyla ilgili bilgiler kısıtlıdır (8).

2.8.1. Yaptığı Epidemiler ve Mevsimsel Değişiklikler

Parvovirus B19'un tepe insidansı, ılıman iklimlerde çoğunlukla kış sonu ve bahar başındaki aylarda mevsimsel çeşitlilik gösterir. Virusun her 4 yılda bir epidemik pik yapacağı düşünülmektedir. Örneğin; Jamaika'da orak hücreli anemili hastalarda aplastik kriz aktivitesinin her dört yılda bir artış gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde Kelly ve ark. (40) tarafından yapılan bir çalışmada, ılıman iklimlerde enfeksiyona neden olan virusun, Avustralya'da epidemik iki yıl ardından gelen iki endemik yılla, parvovirus aktivitesinin dört yıllık siklus yaptığı saptanmıştır (8, 40). Eritema enfeksiyozum ya da PV-B19 ile indüklenmiş geçici aplastik krizin yayılması sırasında olgu dağılımı; 5 yaşından küçük çocuklarda %10, 5-15 arası yaştaki çocuklarda %70 ve 15 yaş üstü hastalarda %20 olmaktadır (8). Seronegatif kişilere ikincil yayılma çok yaygın görülen bir olaydır. Okul ya da ev ortamındaki tespitlere göre; eritema enfeksiyozum epidemileri sırasında ikincil atak oranı, duyarlı çocuklarda %50, duyarlı öğretmenlerde %20-30 arasındadır. Günlük çocuk bakıcısı ve ev hanımı olan kadınlarda çocuklarla yakın temas halinde bulunulması nedeniyle enfeksiyon riski %9 oranında iken diğer ortamlarda çalışan kadınlarda bu risk oranı %4'e düşmektedir. Sağlıklı kişilerde mesleki risk gruplarını en yüksek oranda; çocuklarla sürekli etkileşim içinde bulunan kreş çalışanları, ilkokulda çalışan personel, doktorlar ve bu virusla çalışma yapan laboratuvar personeli oluşturmaktadır (8).

2.8.2. Bulaşma Yolları

İnfeksiyonun bulaşı; solunum yoluyla, kan türevi ürünlerin parenteral olarak uygulanması, kemik iliği ya da organ transplantasyonu ve vertikal olarak anneden fetüse geçiş yoluyla meydana gelmektedir (42). Viremi sırasında solunum sekresyonlarında PV-B19 spesifik DNA'nın tespit edilmesi virusun solunum yoluyla toplumda yayılabileceği kanısını güçlendirmektedir. Bu durum sağlıklı gönüllülerde, intranasal olarak virus inokülasyonundan 5-10 gün sonra, prodromal faz sırasında PV-B19 DNA'sının serum ve solunum sekresyonlarında pozitif bulunması ile belirlenmiştir. Yalnız kan bağışçısının kan ürünleriyle bulaş nadir olarak (1:50,000) görülmekte iken kan konsantreleri havuzu ile tedavi alan kişilerde bulaşma riski daha fazla ve yaygındır. Benzer bir şekilde kemik iliği ya da organ transplantasyonu ile de bulaş olabilmektedir (8, 42). Üreme çağındaki kadınların %50-60'ında dolaşımında IgG bulunmaktadır ancak yine de miktar olarak yeterli değildir (5). Serolojik olarak doğrulanmış akut maternal enfeksiyona sahip olguların 1/3'ünde vertikal bulaş oluşmaktadır. Nozokomiyal bulaş sık olmamakla birlikte tanımlanmıştır ve salgınlar sırasında yetişkin, pediatrik ve yeni doğan ünitelerinde önemli olabilmektedir (8, 42). Çalışmalarında doğal virus kullanan araştırma laboratuvarlarında da virus bulaşı rapor edilmiştir (8).

2.9. Klinik Belitiler

2.9.1. Asemptomatik İnfeksiyon

Subklinik olarak PV-B19 enfeksiyonu hem çocuk hem de yetişkinlerde yaygın olarak görülür. Yapılan bir çok çalışmaya göre enfekte kişilerin %25'inde spesifik semptomlar gözlemlenememiş olup, IgM pozitif kişilerin yarısından daha az kısmında artralji ya da kızarıklıkların işaretleri görülmüştür. Hemolitik anemili hastalarda son transfüzyonda izlenen asemptomatik serokonversiyonun, konağın defektif eritrositlerinden daha uzun yaşam süreli eritrositlerin transfüzyonu ile semptomların

maskelenebileceği fikrini doğurmaktadır. Aynı zamanda bazı olgularda nonspesifik semptomların yaygın grip infeksiyonlarından ayırt edilemeyeceğini de belirtilmektedir (8).

2.9.2. Eritema İnfeksiyozum (Beşinci hastalık)

Eritema infeksiyozum (Eİ) infekte kişilerin %25-50'sinde görülen asemptomatik bir infeksiyon olmasına rağmen, immünokompetent konaklarda PV-B19 infeksiyonunun en yaygın klinik bozukluğudur. Eritema infeksiyozumun diğer bir adı da, çocukluk dönemi salgınları sırasında o dönemin yaygın infeksiyonları listesinde beşinci sırada bulunması nedeniyle beşinci hastalıktır (9). Anderson ve ark. (5) tarafından Eİ tanısı ilk kez 1983 yılında Londra'da bir ilkokuldaki salgın sırasında konmuştur. Anderson ve ark. (5) bu salgın sırasında infekte hastalardan aldıkları serum örneklerinde PV-B19 spesifik IgM'i saptamışlar ve böylece Eİ ile PV-B19 arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı başarmışlardır. Eİ'nin inkübasyon süresi ortalama 17-19 gündür. Bu dönemde prodromal semptomlar olarak düşük düzeyde ateş, başağrısı, konjunktivit, üst solunum yolu şikayetleri, öksürük, miyalji, bulantı ve diyare gibi semptomlardan bir veya birkaçı gözlemlenebilir. Diğer semptomlar kaşıntı, kabarma ve pullu dermatiti içerir (5). Klasik olarak okul çağı çocuklarında Eİ, düşük derece ateş, kırgınlık ve tokatlanmış yanak sendromu ismine neden olan karakteristik yüz kızarıklığı gibi etkilerle kendini belli eder. Bazı Eİ'li çocuklarda artralji oluşabilir fakat yetişkinlerde çocuklardaki kadar yaygın değildir. Tokatlanmış yanak görünümü; gövde, sırt ve ekstremitelere makülopapüler kızarıklığın bir ya da ikinci hafta içinde yayılması ile gözlemlenir. İnfeksiyon normalde kendini sınırlar fakat güneş ışığı, sıcaklık, heyecan ya da aşırı egzersiz gibi koşullara maruziyeti izleyen bazı aylarda rekürren olabilmektedir. Kızarıklık ve eklem tutulumuna muhtemelen immün kompleks birikimi neden olmaktadır (9).

2.9.3. Artropati

İlk kez 1985’de yapılan çalışmalar sonucunda artropati ile PV-B19 infeksiyonu arasındaki ilişki ortaya çıkmıştır (8). Yaklaşık olarak Eİ yetişkin olgularının %50’si haftalarca hatta aylarca persistant olabilen eklem tutulumları ile ilişkilidir ve yıl içerisinde birkaç olgu görülebilmektedir. Eİ’nin ateşi ve tipik yüz kızarıklığı yetişkin olguların yalnızca küçük bir kısmında görülmektedir. Artropati özellikle orta yaşlı kadınlarda yaygındır (%60 kadın-%40 erkek) ve tipik el ya da ayak bileği, diz ve metakarpofalangeal eklemleri kapsayan poliartrit ile karakterizedir. Hem artralji hem de inflamatuvar artritler oluşabilir ve hatta bazen artropati klasik romatoid artritlere benzer. Eklem tutulumu aşındırıcı olmamakla birlikte, antikorların sirkülasyonu ile eş zamanlı görüldüğü için muhtemelen immün mediatörler aracılığıyla oluşmaktadır. PV-B19 DNA’sı esas olarak hem kronik hem de akut infekte kişilerin biyopsileri ve sinoviyal sıvılarında tespit edilmiştir. PV-B19 infeksiyonu romatoid artrite benzetildiği ve hatta romatoid faktör için pozitif teste neden olmasına karşın bu hastalığın etiolojisindeki rolü tam anlamıyla anlaşılamamıştır (9).

Kerr ve ark. (9) 2002 yılında PV-B19 infeksiyonu sırasında, HLA-DRB1 *01, *04 ve *07 alelleri taşııcılığı ve semptomların gelişimi arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. Böylece PV-B19 ilişkili artritlerin kısmen de olsa genetik olarak ilişkili olabileceği ve yapılan daha önceki çalışmalarda HLA DR4 ya da B27’li kişilerde daha yaygın olabileceği kanısına varılmıştır. Artropatinin oluşma mekanizmasının bir bölümü ise anlaşılamamıştır. İmmün aracılı inflamasyona ek olarak bir hipotez ise PV-B19 VP1 özgül bölgesindeki motifden fosfolipaz A₂ salgılanması ile sinoviositlerin aktivasyonunu içermektedir. Bu aktiviteden dolayı sinoviyal dokularda inflamatuvar yanıt hızlanabilir. PV-B19 NS1 ise infeksiyon ilişkili otoimmün hastalıklarda, inflamasyon ve artrit oluşmasına katkıda bulunan proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına yol açar. Diğer yandan VP2 peptit deriveleri, insan kardiolipin, kollajen ve keratin otoantikorlarına ile çapraz reaksiyona neden olabileceğinden PV-B19 artropatisinde patojenik bir önem arzemektedir (9).

2.9.4. Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi

Parvovirus B19 infeksiyonu romatoid artrit ve başka, sistemik vaskülitler, diğer konnektif doku hastalıkları ve sistemik lupus eritematozus (SLE)'u içeren çoğu otoimmün hastalıkların başlangıcı ile ilişkilendirilmiştir. Eroziv romatoid artrit ve birkaç SLE olgusu ile ilişkilendirilmesine rağmen muhtemelen çok nadir olarak bu hastalıklarla ilişkilidir. Akut PV-B19 infeksiyonundan sonra, gigant hücre artritleri, periartiritis nodosa ve Henoch-Schönlein purpurasını içeren sistemik vaskülitler oluşabilmektedir. PV-B19'un bu hastalıklardaki rolü açık değildir ve bazı olgularda bulunması tesadüf olabileceği gibi başka olgularda ise bir tetikleyici olabilmektedir. Sonuç olarak immünogenetik yatkınlık faktörleri bulunan kişilerde PV-B19 artropatiye neden olabilmesi sonrasında bununla ilişkili olarak şiddetli, uzun süreli morbitideye sebep olabilmektedir (7, 9).

Parvovirus B19 infeksiyonunu da kapsayan birçok viral infeksiyonlar antikorların üretimine sebep olmaktadır. Bu yanıtlar normalde kısa sürelidir ve tanısal farklılıklar yaratabilirler. PV-B19 infeksiyonu; romatoid faktör, kardiopilin, anti-nükleer çözünebilir antijenler ve çift zincirli DNA'ya karşı antikorlara sebep olabilmektedir. Otoantikorların üretimi büyük olasılıkla hem immün yanıtın poliklonal stimülasyonu hem de polispesifik anti-PV-B19 antikorlarının üretiminden kaynaklanmaktadır (7, 9). Hücrel otoantijenler ile viral epitoplara arasındaki moleküler benzerlik ve anti-idiotip antikorların üretimi kendi kendine karşı antikorların üretimine ve otoimmün reaksiyonlara katkıda bulunmaktadır. PV-B19 infeksiyonu sırasında, özellikle interlökin-1 (IL-1), IL-6, gama interferon ve TNF alfa (TNF- α) gibi proinflatuar sitokinlerin yüksek seviyeleri gösterilmiştir. IL-6 ve TNF- α üretimi viral transaktivatör NS1 tarafından stimüle edilebilir. PV-B19 infeksiyonu sırasında sitokin yanıtındaki genetik çeşitlilik gelişen semptomların olasılığı ile ilişkilidir (7, 24).

2.9.5. Geçici Aplastik Kriz (Transient Aplastic Crisis, TAC)

Parvovirus B19 infeksiyonunun en ciddi bulgularından biri olan geçici aplastik kriz ilk kez hemolitik anemili hastalarda tanımlanmıştır. Hem eritrosit kaybının artışı hem de eritrosit üretiminde azalma gözlenen hastalarda, geçici aplastik krize yol açan PV-B19 infeksiyonu için potansiyel bir risk vardır. Bu nedenle herediter sferositoz, glikoz 6 fosfat dehidrogenaz ve pürivat kinaz eksikliği, primidin-5'-nükleotidaz eksikliği, orak hücreli anemi, otoimmün hemolitik anemi, kan kaybı, sıtma, paroksizmal nokturnal hemolitik anemi gibi artmış eritrosit yıkım ya da kaybı ve α - ve β - talasemi, demir eksikliği anemisi, konjenital diseritropoietik anemi gibi azalmış eritrosit üretimi durumlarında geçici aplastik kriz gözlenebilir. PV-B19, eritroid progenitör hücreleri infekte eder ve kemik iliği süpresyonuna yol açar. Kırmızı hücre üretiminin geçici olarak durması sonucu viremi sırasında 1-2 hafta kadar süren anemi gerçekleşir. Kırmızı hücre yıkımı arttığı zaman, ölümcül olabilen hemoglobin seviyesinde aşırı düşüş meydana gelir. PV-B19, özellikle eritroid üretiminin geçici durmasına neden olmasına rağmen ek olarak megakaryositler gibi diğer hücreleri de etkileyebilmekte ve klinik olarak önemli trombositopeni, nötropeni hatta pansitopeniye sebep olabilmektedir. İmmün yanıtın infeksiyonu ekarte etmesinden sonra kırmızı hücre üretimi kaldığı yerden devam eder ve çoğu olguda ileride bağışıklığı takiben yaşam boyu normal olarak devam eder. Buna rağmen tersi durumda aplastik kriz; akut dalak sekestrasyonu, serebrovasküler olaylar ve konjestif kalp yetmezliğine neden olabilen aşırı hatta ölümcül anemiye neden olabilmektedir (8, 9).

2.9.6. İmmünokompromize Kişilerde PV-B19 İnfeksiyonu

İmmünokompromize konaklarda persistent ve akut PV-B19 infeksiyonunun klinik tablosu immünokompetent olanlardan önemli derecede farklıdır. Humoral ve/veya hücrel immün yanıt eksikliğinde infeksiyon, kronik anemi ile kendini gösteren persistent kemik iliği süpresyonuna neden olabilir fakat immün-aracılı olarak kabul edilen kızarıklık (rash) ve artralji gibi semptomlara neden olmamaktadır. Predispozan koşullar; konjenital immün yetmezlikler, lösemi, lenfoma, miyelodisplastik

sendrom, kemik iliği ve solid organ transplantasyonu, kemoterapi ve insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile infekte olmayı içermektedir (9).

Parvovirus B19 enfeksiyonu organ ve kök hücre transplantasyonu yapılan hastaların %1-2 kadarında ise yaşamı tehdit eden komplikasyonlara neden olmaktadır. Pansitopeniler ya da farklı hematolojik hücre soylarındaki tanımlanmış eksiklikler, ilaç toksisitesi, greft yetmezliği, diğer mikrobiyal enfeksiyonlar ya da altta yatan malign hastalığın nüks etmesi olarak yanlış yorumlanmamalıdır. Çoğu immün yetmezlikli hastalarda kronik anemi ile ilişkili persistant enfeksiyonların oluşma sebebi; virusa karşı üretilen nötralizan antikorların üretimini etkilenmesi olarak belirtilmektedir (9). Kronik aneminin yanısıra nadirde olsa immünkompromize hastalarda B19 enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiş başka bozukluklar da vardır. Bu bozukluklar; meninjit, ensefalit, hepatit, miyokardit, nöropatiler, fibromiyalji, poliarteritis nodosa, vasküler ve Schönlein-Henoch purpurasını içermektedir (10).

2.9.6.1. Hematolojik Malignite ile PV-B19 Enfeksiyonu Arasındaki İlişki

Hematolojik maligniteler için kemoterapi alan çocukların %10'u ve yetişkin hastaların %5 kadarında PV-B19 enfeksiyonu aşırı hatta letal sitopenilerle sonuçlanır ve bu hastalar virus ile persistant olarak infekte dirler (9). İmmünokompetent çocuklarda miyelodisplastik sendrom (MDS) ile ilişkili akut PV-B19 enfeksiyonu belirtilmiştir. PV-B19 enfeksiyonu ile birlikte yardımcı predispozan faktörlerden kronik anemi ya da subklinik immün yetmezlik, displazi oluşumu için uygun koşullar sağlayabilir. MDS altında sınıflandırılan juvenil miyelomonositik lösemi (JMML)'ye benzeyen akut PV-B19 enfeksiyonu olguları da belirtilmektedir (18).

Parvovirus B19 enfeksiyonu birçok literatürde lösemi ile anılmaktadır. Lösemili yetişkin ve pediatrik hastalarda immün sistemin başkılanmış olması nedeniyle kronik PV-B19 enfeksiyonunun gelişebileceği belirtilmiştir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL)'li hastalarda PV-B19 enfeksiyonunun persistant anemi, artropati ve eritema infeksiyozuma neden olabileceği belirtilmektedir. Aynı zamanda ALL'li hastalarda PV-B19 enfeksiyonu trombositopeni, sitopeni ve hatta pansitopeniye neden olabilmektedir (18). Bir grup akut lösemili çocukta yapılan bir çalışmaya göre uzun süreli kemoterapi

kesilmesinin gün sayısı, parvovirus ile infekte olanlarda, infekte olmayan kişilerden önemli derecede daha yüksektir. PV-B19 infeksiyonunun erken tanısı bu nedenle oldukça önemlidir ve infeksiyon erken dönemde ya kan transfüzyonu ya da intravenöz immünoglobulin uygulaması ile tedavi edilebilmektedir (9).

Zaki ve ark. (43) tarafından 2009'da yapılan bir çalışmada kemoterapi alan ve henüz tanısı yeni konmuş akut lösemili hastalar sırasıyla Grup 1 ve Grup 2 olarak iki ana gruba bölünmüş ve PV-B19 hem EIA hem de PZR metodları ile araştırılmıştır. Aynı zamanda bu hastaların kliniğine bakılarak PV-B19 infeksiyonu ile lösemi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu hastalarla karşılaştırılmak için 20 sağlıklı gönüllü kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Grup 1'deki 45 hastada IgM pozitifliği 14/45 (%31,1), IgG pozitifliği 18/45 (%40) ve PV-B19 DNA pozitifliği 10/45 (%22,2) olarak belirtilmiştir. Grup 2'deki 40 hastada ise IgM pozitifliği 20/40 (%50), IgG pozitifliği 16/40 (%40) ve PV-B19 DNA pozitifliği 18/40 (%45) olarak belirtilmiştir. Kontrol grubunda ise 20 sağlıklı kişide hiçbir PV-B19 belirtilmemiştir. Akut infeksiyon geçiren Grup 1'deki hastalarda hemoglobin seviyesinde aşırı düşüş gözlemlenirken, istatistiksel olarak anlamlı derecede lenfositoz görüldüğü belirtilmiştir. Akut infeksiyonlu Grup 2 hastalarında ise istatistiksel olarak anlamlı lenfositoz ile birlikte nötropeni ve trombositopeni gözlemlenmiştir. Her iki gruptaki akut infeksiyonlu hastalarda lenfadenopati ve hepatosplenomegalinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa sahip olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak PV-B19 infeksiyonunun, hem yeni tanısı konmuş olan hem de kemoterapi alan akut lösemili çocuklarda sitopeniye neden olan önemli etkenlerden biri olduğu kanısına varılmış ve bu olayın kemoterapinin planlanmasını etkileyeceği vurgulanmıştır. Ayrıca PV-B19 infeksiyonunun varlığı lenfadenopati ve hepatosplenomegali belirteçleri ile ilişkilendirilmiştir (43).

Kaptan ve ark.'nın (44) yaptığı bir çalışmada PV-B19 infeksiyonu ile polisitemia vera (PV) arasındaki ilişkiyi gösteren ilk olgu sunumu yapılmıştır. Olgunun 68 yaşında 10 yıllık diabetes mellitus, iki yıllık PV tanılı bir hasta olduğu belirtilmiş ve bu nedenle interferon- α tedavisi ve oral antidiabetik ilaçlar aldığı belirtilmiştir. Kan değerlerindeki ve hematolojik incelemelerdeki anormallikler nedeniyle yapılan taramalarda PV-B19 spesifik IgM ve IgG antikoru yüksek titrelerde bulunmuş. Aynı zamanda periferik lenfositlerde ve nükleuslu kemik iliği hücrelerinde PV-B19 spesifik primerler kullanılarak PV-B19 DNA PZR metoduyla tespit edilmiş. PV-B19 infeksiyonu kırmızı

kan hücresi üretimini baskılayabilmektedir. Bu nedenle kronik hemolizisli hastalarda hemoglobin konsantrasyonunun geçici olarak düşüşüne neden olabilmektedir. Bu olguda da kırmızı kan hücresi yapımı durmuş ve eritropoietin yanıtın eksikliği ile anaemi oluşmuştur. Aynı zamanda enfeksiyon, immünokompromize hastalarda kronik kemik iliği yetmezliğine neden olabilir. Diabetes mellitus ve interferon- α tedavisinin immünyetmezlik oluşumuna katkı sağlayacağı göz önünde bulundurulursa bu olgunun da immünokompromize bir kişi olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle hastanın PV-B19 enfeksiyonuna daha duyarlı hale gelmiş ve sonuç olarak anemi geliştiği vurgulanmıştır (44).

MDS, AML ve ALL gibi hastalıklar klonal kök hücre hastalıklarıdır. Bu hastalıkların patogenezi tamamen aydınlatılamamıştır. Bunların gelişmesi ve ilerlemesinde mutasyonlar ve epigenetik olaylar önemli bir rol oynayabilmektedir. DNA metilasyonu insanlarda epigenetik modifikasyonların sıklıkla başında gelmektedir. Epigenetik değişiklikler kromatin yapısını etkiler ve dolayısıyla transkripsiyon, X kromozomu inaktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu gibi süreçleri düzenler. DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun inaktivasyonu insan kanserlerinin başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayabilmektedir (45, 46).

Memeli genomunda gen metilasyonu yalnızca CpG dinükleotitteki sitozin bazlarında yer alır. CpG adacıkları genomdaki tüm genlerin %50'sine yakınının promoter bölgesinde lokalizedir ve genellikle normal hücrelerde unmetiledir. P15^{INK4B} ve onun fonksiyonel homoloğu olan P16^{INK4A} siklin-bağımlı kinazlar 4 ve 6 yoluyla hücre döngüsünü inhibe eder ve G1'den S fazına geçişi düzenler. P15^{INK4B} promoter metilasyonu geni bastırır ve böylece hematopoyetik hücrelerin hiperpoliferasyonunu sağlar. MDS ve akut lösemide birçok gen hipermetilasyon göstermektedir. Birçok araştırmacı P15^{INK4B} gen inaktivasyonunun lökomogenezde önemli bir rol oynayabileceğini düşünmektedirler. AML, ALL ve ilerde AML'ye dönüşebilen MDS'da P15^{INK4B}'nin sıklıkla hipermetile olabileceği bildirilmiştir (46).

Özellikle hepatit B virus (HBV), hepatit C virus (HCV), insan papilloma virus (HPV), Epstein-Barr virus (EBV), insan T hücre lösemi virus-1 (HTLV-1) ve insan herpes virus-8 (HHV-8) gibi birçok virus kanserle ilişkilendirilmiştir. Örneğin; hepatokarsinomaya neden olabilen HBV ve HCV P16^{INK4A} metilasyonu gibi bazı metilasyon çeşitleri ile ilişkilendirilmiştir (46). Buradan yola çıkılarak akut lösemide

PV-B19'un rolünü düşünen birçok çalışmada vardır (45, 46, 47). Örneğin; Yalçın ve ark. yaptıkları bir çalışmada akut lösemili hastalarda P15^{INK4B} promoter metilasyonu ve PV-B19 DNA pozitifliği arasında anlamlı bir yakınlık ilişkisi bulunduğu belirtilmektedir (46).

2.9.7. Gebelik ve PV-B19 İnfeksiyonu

Parvovirus B19 infeksiyonu fetüste klinik olarak belirtisiz olabileceği gibi nörolojik belirtiler, miyokardit, trombositopeni, nonimmün hidrops fetalis (NIHF) ve intrauterin fetal ölüm ile de ilişkilidir (48). Gebe kadınlar %30-50 PV-B19'a duyarlı olmasına rağmen sadece küçük bir yüzdesi PV-B19 ile infekte olabilmektedirler. PV-B19 spesifik IgG serokonversiyonu gebe kadınlarda epidemik periyotlarda %1-1,5'dan %13-13,5'a kadar artabilmektedir. İnfekte gebe kadınların %50'sinin üstünde infeksiyon asemptomatik olabilir fakat vertikal geçiş hala oluşabilir, geçiş olsa bile haftalar hatta aylar boyunca fetal belirtiler oluşmayabilir (42).

2.9.7.1. Nonimmün Hidrops Fetalis ve Fetal Ölüm

Nonimmün hidrops fetalisin gelişimi ve fetal PV-B19 infeksiyonu arasındaki ilişki ilk kez Brown ve ark. (9) tarafından önerilmiştir. Brown ve ark. nonimmün hidrops fetalis vakalarının %15-20 kadarının PV-B19'un sebep olabileceğini ileri sürmüşlerdir (9). PV-B19'un hidrops fetalise neden olacağını tesbiti halk arasında büyük bir endişeye yol açmıştır. O zamandan günümüze kadar fetal PV-B19 infeksiyonunun kendini sınırlayan olgularda asemptomatik seyredebileceği gibi, aynı zamanda düşük, ölü doğum, konjenital anemiye de neden olabileceği bulunmuştur (8). Gebe kadınların yaklaşık %50'si PV-B19 infeksiyonuna duyarlı olmasına rağmen, fetüse vertikal geçiş riski yaklaşık olarak %30 kadardır. Plasenta üzerinden geçişin büyük olasılıkla ilk ve ikinci trimesterde oluşabileceği bildirilmiştir. Geçiş için gerekli olan plasental P antijenidir. Bu olay artan gebelik yaşı ile daha az gerçekleşmektedir. İnfeksiyon, fetal hidrops fetalisin gelişiminin yanı sıra; kalp yetmezliğine yol açan olası

miyokardit, karaciğer inflamasyonu, hipoalbuminemi, anemiye neden olabilmektedir. Maternal ve fetal infeksiyon semptomları arasındaki yaklaşık 6 hafta gibi belirli bir zaman aralığında bu koşullar giderilebilir fakat aynı zamanda fetal ölümle de sonuçlanabilir. Ancak birkaç aylık nadir olgularda da bu durum gözlemlenebilir. Fetal PV-B19 infeksiyonu aynı zamanda asemptomatik de olabilir. Göbek kordonunda intrauterin infeksiyon tanısının bulgusu olarak IgM'in gösterilmesine rağmen sağlıklı doğan birkaç yeni doğan olgusu da mevcuttur. İzole edilmiş birkaç olguda intrauterin PV-B19 infeksiyonunun sonucu olarak malformasyonlar rapor edilmiştir fakat bunun infeksiyonun genel bir belirtisi olabileceği sonucuna varılamamıştır (9).

Fetal zararın patogenezi yaşam süresi azalmış eritrositlere sahip olan aplastik krizli hastaların patogenezi benzerlik göstermektedir. Fetal karaciğerdeki eritroblastlar antijen, viral DNA ve patogenomik sitopatolojiyi kapsayan PV-B19 infeksiyonunun işaretlerini gösterirler. Uterusta infeksiyon persistanttır ve şiddetli anemi, yüksek derecede kalp yetmezliği ve ölümle karakterizedir. Fetal miyokardit nedeniyle bozulan sirkülasyon sıvıların birikimine katkıda bulunabilir. Gebelik sırasında primer PV-B19 infeksiyonu insidansı %1-5 olarak tahmin edilmektedir ve bunu takiben transplasental geçiş oranı %24-33 arasındadır. Bu infeksiyonu izleyen hidrops fetalis gelişme riski ilk çalışmalarda %0-24 arasında iken, son çalışmalarda çeşitlilik göstermiş ve bu oran düşüş göstererek %1-1,6 oranına gerilemiştir. Buna rağmen akut infeksiyon doğrulanmış gebe kadınlarda anormal sonuçun toplam riski yaklaşık olarak %5-10 arasındadır. Hidrops fetalis 1/3000 oranında nadir görülür ve olguların %20-50'sinde etiyoloji anlaşılamamaktadır (8).

Parvovirus B19 infeksiyonu ile ilişkili fetal ölüm çoğunlukla gebeliğin 20-24 haftaları arasında meydana gelir. Fakat 10 hafta kadar erken ve 41 hafta kadar geç gebelik dönemlerinde de tanımlanmıştır. Syridou ve ark. (48) tarafından 62 fetal ölüm olgusunda 8 PV-B19 PZR pozitifliği, karşılaştırma amaçlı 35 sağlıklı gönüllüde ise 1 PV-B19 PZR pozitifliği bildirilmiştir. Ancak örnek sayısının azlığı, özellikle de kontrol grubunun sayıca azlığı bu verileri istatistiksel olarak anlamlı yapmamaktadır. Norveç'te yapılan bir çalışmada fetal ölüm ve gebelik sırasında PV-B19 için maternal serokonversiyon arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Bu çalışmada intrauterin fetal ölüm gözlemlenen 65 kadında 2 pozitif serokonversiyon (%3,1) saptanırken, sağlıklı çocuk doğuran 307 kadında ise 8 pozitif serokonversiyon (%2,6) saptanmıştır. Bu çalışmada

PV-B19 için serokonversiyon gösteren kadınlarda intrauterin fetal ölüm için istatistiksel anlamlılığı arttırmamıştır. Çünkü her iki grupta da PV-B19 ile infekte fetüslerin sayısı tanımlanmamış ve plasental ve fetal araştırmalar yapılmamıştır. Yapılan bu gibi çalışmaların sayısı artıkça intrauterin fetal ölüm ile PV-B19 arasındaki ilişki ilerleyen zamanlarda netleşecektir (48).

2.9.7.2. Konjenital Anemi

Parvovirus B19 ile ilişkili hidropik fetüslerin rapor edildiği çalışmaların hepsinde hematolojik değerlendirme yapıldığında anemi ortaya konmuştur. Ancak PV-B19 infeksiyonunu izleyen hidropik fetüs serilerinin prognostik çalışmalarında, konjenital anemi olgularının olmadığı da bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada ise transplasental PV-B19 infeksiyonun neden olduğu hidrops fetalis ve konjenital anemili 3 infant tanımlanmıştır. Üçünün de serumunda PV-B19 DNA tespit edilemezken, kemik iliğinde PV-B19 DNA bulunduğu belirtilmiştir. Ölen bir infant ve diğerlerinde immünoglobulin tedavisine devam edilmesine rağmen anemi persistantlığı devam ettiği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise Diamond Blackfan bozukluğu 11 kemik iliğinin üçünde PV-B19 DNA tespit edilmiş ve kemik iliği yaymalarında gigant pronormoblastlar düşük duyarlılık (%33) ve zayıf spesifite (%75) ile gösterilmiştir. Bazı raporlarda ise muhtemel PV-B19 infeksiyonu nedeniyle konjenital aneminin gelişebileceği ve 10 aylıkken immünoglobulin tedavisi başlanması ile 8 ay sonra anemi sorununun kademeli olarak çözümlenebileceği vurgulanmıştır (8).

2.9.8. Parvovirus B19 İlişkili Diğer Hastalıklar

Parvovirus B19 miyositler tarafından ifade edilen P antijeni varlığı nedeniyle kardiotropik potansiyele sahiptir ve PV-B19 DNA kalp dokularında tespit edilmiştir. Kalp yetmezliği ve fetal miyokardit olgularının bazıları hem çocuklarda hem de yetişkinlerde rapor edilmiştir. Diğer PV-B19 ilişkili hastalıklar; hepatit, çocukluk çağı geçici eritroblastopeni, nötropeni, trombositopeni, Kawasaki hastalığı, ensefalit ve

menenjitisi içeren nörolojik hastalıklar, fibromiyalji ve kronik yorgunluk sendromunu kapsar. İlk viral replikasyon bölgesi olan kemik iliğinden diğer dokulara virus yayılabilmektedir. PV-B19 DNA'sı hem PV-B19 ilişkili klinik hastalıklarda hem de sağlıklı kontrollerde deride, karaciğer ve sinovya gibi dokularda bulunmuştur. Romatizmal ve diğer hastalıklarda PV-B19'un etiyolojisi hakkında yazılan raporlarda alınması gereken tedbirin önemini belirtilmektedir (9).

2.10. Laboratuvar Tanısı

Klinik örneklerde viral antijenlerin gösterilmesi amacıyla immün elektron mikroskopisi, radyoimmünoassay, enzim immünoassay (EIA), Western blot ve reseptör bağımlı hemagglütinasyon testleri kullanılmıştır. Yönteme ve kullanılan örneğe göre farklı duyarlılık ve özgüllük gösteren bu testlerin büyük kısmı, yerini özellikle rutin tanıda duyarlılık ve özgüllükleri daha yüksek ve uygulaması daha kolay olan serolojik yöntemlere ve nükleik asit testlerine bırakmıştır (49). Bu nedenle PV-B19 enfeksiyonu için modern tanı yöntemleri, genellikle kanda IgG ve IgM antikorlarının ve PZR ile kan ya da doku örneklerinde PV-B19 DNA tanımlanmasını içermektedir. Akut enfeksiyon sırasında morfolojik olarak kemik iliği aspiratları incelendiğinde karakteristik gigant pronormoblastların görülmesi tanı koymada yardımcıdır ancak özgüllüğü düşüktür. Aynı zamanda immünohistokimya analizleri, plasenta ya da fetal enfeksiyon olgularında daha spesifik ve daha duyarlı olan PZR testlerini tamamlayıcı da olabilmektedir (9).

2.10.1. Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Depolanması

Serolojik testler için en uygun yöntem serumun antikoagülan içermeyen steril tüpe alınmasıdır. EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetikasit) ya da sodyum sitrat içeren plazmada kullanılabilir. Laboratuvara nakledilen kan örnekleri 2-8 °C'de tutulmalı ve eritrositlerin lizisini minimuma indirmek için tam kan örnekleri düşük ısılarda nakledilmez. Tam kandan ayrılan serum ya da plazma, kısa süre bekletilecekse 2-8 °C'de daha uzun süreli bekletilecek ise -20 °C ya da -70 °C'de saklanmalıdır (5).

İn situ hibridizasyon veya nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) ile PV-B19 DNA'sının belirlenmesi ya da immünohistokimya veya immünohistokimya yöntemleriyle antijen tespiti için uygun klinik örnekler; periferik kan, deri kazıntısı, kemik iliği aspiratları, kord kanı, amniyotik sıvı, plasenta ya da fetal dokulardan elde edilen biyopsi örnekleridir (5, 50). Kemik iliği ve kord kanı numuneleri, koagüle olmaması için EDTA ya da sodyum sitrat içeren steril tüplere toplanmalıdır. Heparin Taq-DNA polimeraz üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı NAAT'de kullanılmamalıdır. Amniyotik sıvı antikoagülan içermeyen steril tüplere toplanmalıdır. Plasental ve fetal dokular %10 tamponlanmış formalin içinde fikse edilebilir ya da direk viral transport besiyerine konulabilir. Hüresel ve taze doku numuneleri laboratuvara taşınırken 2-8 °C'de tutulmalıdır. Çalışmaya alınacak numuneler çalışmaya başlamadan önce muhakkak oda sıcaklığına getirilmelidir (5).

2.10.2. Antikor Tayininde Kullanılan Yöntemler

Sağlıklı bireylerde immünolojik bir yöntem olarak viral kapsid antijenine karşı oluşan PV-B19'a spesifik antikorların belirlenmesinde serolojik testler kullanılmaktadır. Doğal PV-B19 kapsid proteini temini zor olduğundan, PV-B19 spesifik testlerin çoğunda, rekombinant gen klonlama teknolojisi yardımı ile hem prokaryotik hem de ökaryotik olabilen rekombinant ekspresyon sistemlerinde viral kapsid proteinleri elde edilir (5, 9).

VP2'ye karşı spesifik IgM antikorları 7-10 gün sonra görülmeye başlar ve 10-14 günleri arasında pik yapar. Varlığı bazen uzun süreli saptanabilse de genellikle 3-4 ay içinde kaybolur (48). IgG değişimi ve matürasyonu, IgM'in ortaya çıkışından kısa bir süre meydana gelmektedir. Bu antikorların PV-B19 ile karşılaştıktan sonra artan titreleri sonra yavaş yavaş azalmaktadır ve bu yüksek aviditeli antikorların yaşam boyu immüniteyi sağlayacağına inanılmaktadır. Aynı zamanda IgA antikorları da kısa süreli olarak tespit edilebilir ve bu tip antikorlar solunum yolunda koruyucu rol oynayabilmektedir. Bu sayılan antikora ek olarak uzun süreli PV-B19 spesifik IgE antikorları da gösterilmiştir fakat biyolojik fonksiyonları açık değildir. IgG hem VP1 hem de VP2'ye karşıdır. Lineer epitoplarm çoğunluğu VP1 özel bölgesi (VP1u)'nde ve

VP1 ve VP2 birleşme noktaları arasında lokalizedir. Bu özel bölgelerin en etkili immün yanıtı oluşturduğu belirtilmiştir. VP2 için immünolojik üstünlük gösteren VP1 içindeki lineer epitoplara karşı IgG kaybolduğu zaman bile VP2'ye karşı IgG'nin korunduğu gösterilmiştir. Her iki şekilde de, konformasyonel epitoplara yönelik IgG antikorlarının kalıcılığı normal infeksiyonda yapısal proteinlere karşı oluşan humoral yanıtlar görülmektedir. Ayrıca NS1'ne karşı antikorlar, tanımlayan ve olmadığını savunan çalışmalar da vardır (9).

Gebe kadınlarda ve immün yetmezliği olan kişilerde seroloji yorumlanırken dikkatli olunmalıdır. Çünkü bu kişilerde immün durumu nedeniyle her patojene karşı antikor yanıt daima gerçekleşmeyebilir ya da oluşan antikor yanıtı çok zayıf olabilir. Dahası kan ürünleri ya da immünoglobulinler ile tedavi, PV-B19 IgG için yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Tamamlayıcı serolojik testlere ise ara sıra, tanı doğrulama ve gebelik sırasında maternal infeksiyonun fazını belirlemek için ihtiyaç duyulmaktadır. PV-B19 ile infekte bireylerle temas eden gebelerde standart olarak ilk kullanılan yöntem serolojik olarak PV-B19 spesifik IgG ve IgM antikorlarının aranmasıdır. Fakat antikor üretiminin yetersiz olduğu fetüs, yeni doğan ve immün sistemi baskılanmış kişilerde serolojik test uygun bir yaklaşım değildir. Bu gibi durumlarda nükleik asit amplifikasyon testleri kullanılması daha uygundur (8, 9).

Enzim İmmünoassay, PV-B19 spesifik antikorların aranmasında standart olarak kullanılan rutin testtir. Bir çok çalışmada PV-B19 spesifik IgG EIA yönteminin doğruluğunun artması için konformasyonel kapsid antijeninin kullanılması gerekliliği gösterilmiştir. Bunun nedeni VP1 lineer epitoplarına karşı oluşan IgG antikorlarının infeksiyondan sonra yavaş yavaş dolaşımında azalmasına karşın VP2 antijenlerin konformasyonel epitoplarına karşı oluşan IgG antikorlarının uzun süre dolaşımında kalmasıdır. A.B.D.'nde PV-B19 spesifik serolojik testlerin çoğunda ticari iki test kullanılmaktadır. Bunlarda ilki İrlanda'da Biotrin üretici firmasının ürettiği, FDA onayı almış PV-B19 spesifik IgM ve IgG EIA kitidir. Bu kitte PV-B19 spesifik IgM antikorlarının saptanmasında, yanlış negatif IgM sonuçlarının en aza indirilmesi için dizayn edilmiş "µ-capture" EIA formatı kullanılmaktadır. PV-B19 spesifik IgG tespiti için EIA'da baculovirusun ifade ettiği konformasyonel VP2 antijeni kullanılır. Mikropleyt kuyucukları anti-insan IgM antiserumu ile kaplanmıştır ve bu sayede serum ya da plazmada bulunan IgM antikorlarının tümünün solid faza bağlanması sağlanarak

konsantrasyon farkından kaynaklanan IgG antikor yarışı azaltılmıştır. İkinci kit ise California'daki Focus Tanı Laboratuvarı tarafından üretilen, FDA onayı almamış PV-B19 spesifik IgM ve IgG EIA kitidir. Bu kitte rekombinant teknolojisi ile klonlanmış PV-B19 VP1 proteini üreten *E.coli*'den temin edilen VP1 antijenleri kullanılır. Aynı zamanda primer ve sekonder infeksiyon ayrımı için IgG'nin aviditesini ölçebilen EIA'ler de geliştirilmiştir. Ancak ticari olarak henüz piyasaya sürülmediği belirtilmiştir (5). Laboratuvarlar ve test sistemleri arasında PV-B19 IgG sonuçlarının standardize edilmesi için uluslar arası bir standart getirilmesi gereklidir. 2008 yılında bu standartlar, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) uluslararası standartları tarafından yayımlanmıştır (51).

Parvovirus B19 spesifik IgM ya da IgG antikorlarını tespit etmek için EIA'dan başka, indirek floresan antikor (IFA), radyoimmünoassay (RIA) ve Western blot testleri de kullanılmaktadır. IFA yönteminde kullanılan antijen, rekombinant baculovirus ekspresyon vektörü kullanılarak böcek hücrelerinde ifade edilen lineer VP1 proteindir. IFA PV-B19 spesifik IgM antikor testinde kullanılacak serum, yanlış negatif sonuçlara neden olan IgG ile yine yanlış pozitif sonuçlara neden olan romatoid faktör yarışını önlemek için uygun bir absorban reaktifle muamele edilmelidir. Bu testler lineer, denatüre VP1 antijeninin kullanıldığı EIA ile birlikte doğrulama amacıyla kullanılabilir. Western blot testlerinde, VP1, VP2 ve NS1 antijenleri kullanılır ancak kullanılan bu antijenler denatüre olması bu testin tanısal değerini sınırlamaktadır (5).

2.10.3. Antijen Tayininde Kullanılan Yöntemler

Klinik örneklerde PV-B19 antijenlerin gösterilmesi amacıyla ters immünoelektroforez (CIE), immün elektron mikroskopisi (IEM), radyoimmünoassay, enzim immünoassay, blot immünoassay, reseptör bağımlı hemagglütinasyon (RHA) testleri ve immünositokimyasal veya immünohistokimyasal analizler kullanılmıştır (5, 49).

Ters immünoelektroforez, akut dönemdeki PV-B19 infeksiyonunda serum örneklerinde PV-B19 spesifik antijenlerin tespiti için yaygın olarak kullanılmıştır. CIE'de, agaroz jeldeki delinmiş kuyucukların katot (-) ucuna test edilecek serum örneği, diğer karşıdaki kısmına ise PV-B19 pozitif antikor içeren serum konulur. Bu düzenekte

birbirine karşı yürüyen antikor ve antijenin karşılaştığı kısımda antijen-antikor kompleksi oluşursa gözle görülebilen bir presipitasyon hattı belirir. Antijen-antikor kompleksinin oluşması bize şüphelenilen serumun antijen içerdiğini göstermektedir. IEM genellikle diğer PV-B19 testleri ile elde edilen olumlu sonuçları doğrulamak için kullanılmaktadır. IEM'de, serum örnekleri, doğrudan elektron mikroskopisi gözlemlerine göre daha iyi görüntülenen agregate viral partikülleri elde etmek için PV-B19 spesifik antikorları ile karıştırılmıştır. IEM'nin dezavantajı klinik örneklerin yalnızca küçük bir bölümünün test edilmesi için uygun olmasının yanı sıra son derece özelleşmiş aletleri gerektirmesi ve teknik olarak emek istemesidir (49).

Radyoimmünoassay ve EIA, PV-B19 antijeni tespiti için geliştirilmiştir ve CIE ve IEM'ne göre daha gelişmiştir. Genellikle bu testler, test edilecek serumdan PV-B19 antijenleri bir katı faza absorbe edilmiş referans insan immün serumu tarafından görünür hale getirilebilir. Bu immünkompleks daha sonra PV-B19 monoklonal antikorlarına bağlanacak RIA için I^{125} ya da EIA için enzimle işaretlenmiş anti-fare globulini (konjugat) yardımıyla görünür hale getirilir (49).

İmmuno-blot testleri hem Western blot hem de dot-blot formatlarında geliştirilmiştir. Western blot tekniğinde, insan serum örnekleri elektroforez edilir ve sonra nitrosellüloz membrana transfer edilir. Transfer edilen proteinler monoklonal insan PV-B19 spesifik antikorlar ile muamele edilir. Oluşan immünkompleksler enzimle işaretli anti-fare PV-B19 antikorları ile muamele edilir ve ortama enzime uygun kolorimetrik substrat eklenmesiyle oluşan komplekslerin varlığı renk değişimi ile görünür hale getirilir. Dot-blot formatında ise antijenik bölgeleri maruz bırakabilmek amacıyla ön işlemde geçirilen amniyon sıvıları ya da serum örnekleri doğrudan naylon membrana aktarılır. PV-B19 antijenleri iki kapsid proteinine karşı monoklonal antikor havuzu ile tespit edilir ve kompleks immünoenzimatik boyama ile görünür hale getirilir. Dot-blot immünoassay serum örneklerinin geniş çapta taranması için pratik bir test olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu test dört saat gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilir ve dot-blot hibridizasyon sonuçlarından kısmen yüksek ya da kıyaslanabilir duyarlılık göstermektedir (49).

Parvovirus B19 ve insan eritrositleri üzerindeki P antijeni arasındaki interaksiyona dayanan RHA, kan bağışçılarını taramak amacıyla tanımlanmıştır. Dilüe serumun küçük volümleri, V tabanlı mikropleytlere son konsantrasyonun yarısı olacak

şekilde insan O grubu eritrosit (P antijen pozitif) süspansiyonu ile birleştirir ve sonra karıştırılır. Serum örnekleri PV-B19 kapsıyorsa 30 °C'de 1 saat içinde hemaglutinasyon oluşmaktadır (49).

Antijen tespitinde kullanılan immünohistokimyasal veya immünohistokimyasal analizlerde; kemik iliği aspiratları, kord kanı ve amniyotik sıvı numunelerinden hazırlanan sitospin preparatları, piyasada mevcut olan PV-B19 spesifik antikolar kullanılmasıyla PV-B19 spesifik antijen tespitine olanak sağlayabilmektedirler. Aynı zamanda bu antikolar formalin ile fikse edilmiş ya da parafine gömülmüş plasental ya da fetal dokuların viral antijenler açısından immünohistokimyasal analizinde de kullanılabilirler (5, 52).

2.10.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler temel olarak hibridizasyon ya da amplifikasyona dayanan yöntemlerle viral DNA'nın saptanması esasına dayanır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri gibi moleküler yöntemler, serolojik yöntemlerde kullanılan serum ya da plazma dışında; parafin preparatlarından, solunum sekresyonlarından, kemik iliğinden, dalak, amniyotik sıvı ve çeşitli fetal organlardan PV-B19 DNA'sı saptanmasına olanak sağlamaktadır (53). Bu nedenle PV-B19 infeksiyonlarının tanısında sıklıkla kullanılan, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip yöntemler nükleik asit testleridir.

2.10.4.1. Hibridizasyon Yöntemleri

Dot-blot hibridizasyon testleri PV-B19 tespiti için tanı laboratuvarlarında eskiden rutin olarak uygulanan basit bir yöntemdir. Bu teknik naylon membran üzerine filtrelenen ya da nokta halinde geçirilen çok sayıda serum örneğinin aynı testte analiz edilmesine olanak sağlamaktadır. Tampon sıvıda dilüe edilmiş serum örneklerinin küçük kısımları membrana aktarılır ve sonra proteolitik enzimler ile alkali-denatürasyon, nötralizasyon ve parçalama işlemine maruz bırakılır. DNA

moleküllerinin membrana iyice fiksasyonunu sağlamak için bu moleküller UV'e maruz bırakılır. Hibridizasyon için genellikle işaretli PV-B19 probları kullanılmaktadır (54).

Enzim immünoassay mikro kuyucuklarında hibridizasyon testleri serum örneklerinde PV-B19 DNA tespiti için geliştirilmiştir. Digoksinin (digoxigenin) işaretli RNA probları PV-B19 DNA spesifik sekansları tanımak için kullanılır ve biotin işaretli ikinci bir prob streptavidin kaplı kuyucuklarda hibridlerin görüntülenmesinde görev alır. Digoksinin işaretleme kimyasal olarak ışıldayan substrat ve immünoenzimatik reaksiyonla tespit edilmektedir. Mikro kuyucuk hibridizasyon testi kimyasal olarak ışıldayan substratlar nedeniyle, dot-blot hibridizasyon testine göre daha duyarlıdır (55).

İn situ hibridizasyon (ISH) tekniği tek tek hücrelerin içindeki PV-B19 nükleik asitlerinin lokalizasyonunun gösterilmesi için önemli bir araçtır. Bu teknikle infekte hücrelerde morfolojik yapı ve moleküler yapı işbirliği sağlanmaktadır. ISH, PV-B19 enfeksiyonu tanısı için yardımcı olan kemik iliği hücreleri, amniyotik sıvı hücreleri, kord kanı hücreleri ve fetal dokularda PV-B19 DNA'sının tespiti ve özellikle PV-B19 ilişkili hastalıklarda patogenez çalışmaları için kullanılmaktadır. ISH için ya kısa sentetik oligonüklotidlerden ya da klonlanmış uzun DNA fragmentlerinden elde edilen PV-B19 DNA'sı prob olarak kullanılmaktadır. Problar genellikle biotin ya da digoksinin ile işaretlenmiştir. Kolorimetrik bir substrat olan alkalin fosfatase ya da peroksidaz kullanılarak elde edilen ürünler, ışık mikroskobu ile gözlemlenebilir. Kimyasal olarak ışıldayan (kemilüminesan) bir substrat kullanılarak analitik duyarlılık artırılabilir. Ancak bu yöntemin dezavantajı hem uzman eleman hem de yüksek düzeyde teçhizat gerektirmesidir (49).

2.10.4.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

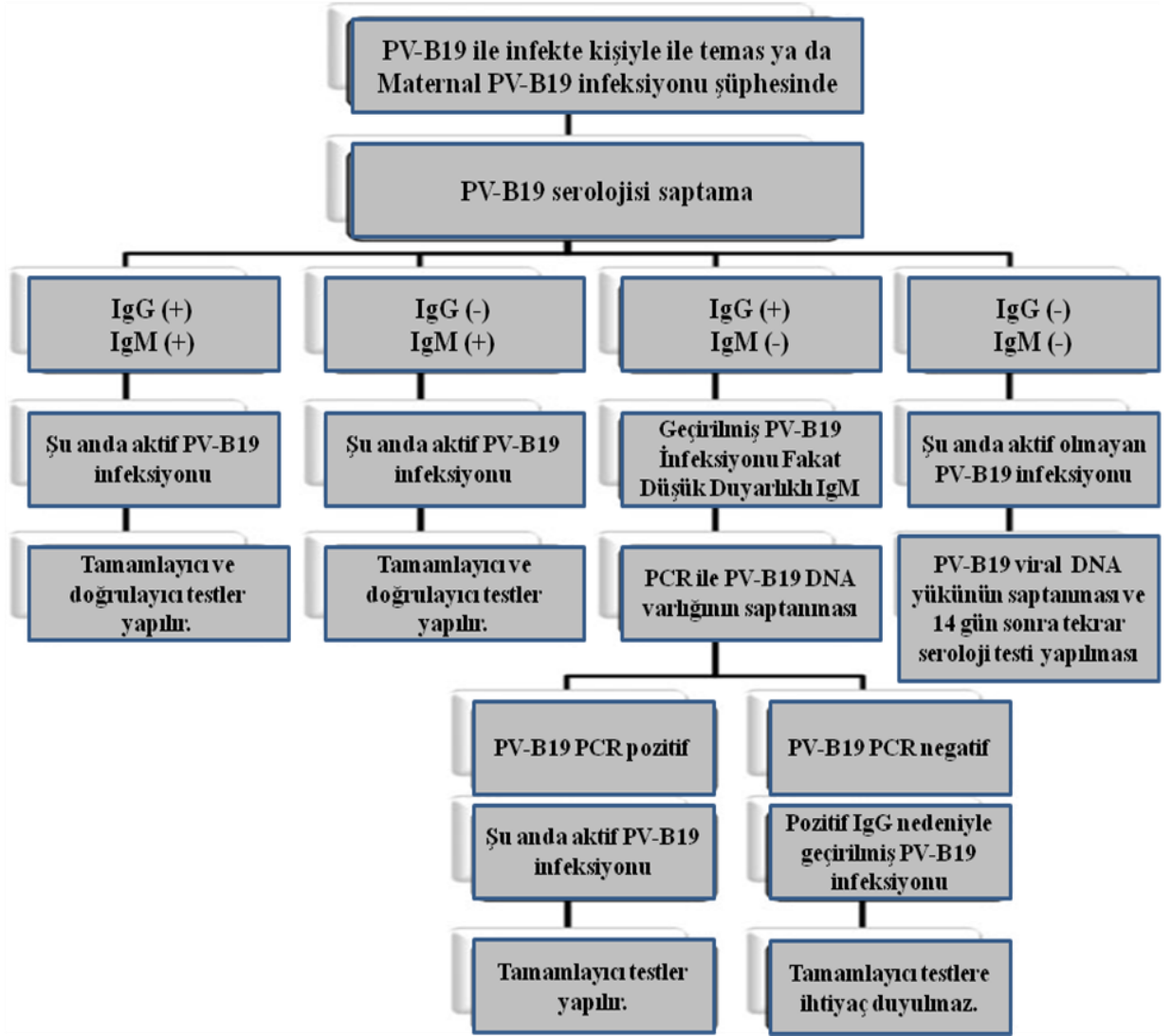
Hibridizasyon yöntemleri yüksek viremi aşamasında akut viral enfeksiyonların tanısı için yeterli duyarlılığa sahip olmasına karşın, mililitrede 10^5 genom kopyasının altındaki düzeylerde yetersiz kalmaktadır. Aynı zamanda hibridizasyon yöntemleri tüm örneklerde uygulanamamaktadır. Bu nedenle günümüzde birçok laboratuvar, rutin tanıda

ve araştırma çalışmalarında “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)” temelli yöntemlere yönelim göstermiştir (5, 49).

Polimeraz zincir reaksiyonu, nükleik asitlerin *in vitro* şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Hedef genom üzerindeki hedef bölgenin selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. PZR, viral enfeksiyonun akut dönemi dışında persistant enfeksiyonlarda düşük düzey vireminin ve doku persistansının gösterilmesinde de diğer yöntemlere göre yaygın olarak kullanılmaktadır (5, 8, 49). PZR testlerinde, PV-B19’un NS1 veya VP genlerinde tanımlanan korunmuş bölgeler PZR reaksiyonu ile çoğaltılmakta ve amplifikasyon ürünleri elektroforez ya da hibridizasyon yöntemleriyle saptanmaktadır. PV-B19 tanısında, kullanılan primer dizisi ve amplifikasyon yöntemine göre farklı duyarlılığa sahip birçok PZR yöntemi vardır. Bunlar; Single-Step PZR, Nested PZR, PZR-ELISA ve Real-time PZR’dir. Single-Step PZR, iki oligonukleotid primer kullanılarak tek aşamada işaretli internal proba hibridize olan hedef bölgenin çoğaltılmasına dayanır. Nested PZR’da, iki set primer ile iki aşamalı PZR yapılarak daha spesifik bölgeler çoğaltılır. İlk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef PV-B19 genomu üzerinde uzunca bir bölgenin 15-30 siklus kadar amplifikasyonu yapılmaktadır. Sonra bu amplifikasyon ürününün kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle 15-30 siklus kadar çoğaltılmaktadır. Nested PZR duyarlılığı tek aşamalı PZR’dan 10-100 kat fazladır (49, 53). PZR-ELISA’da ise hibridizasyon aşaması ELISA plaklarında immünoenzimatik reaksiyonla gerçekleştirilir. Hedef ve internal standartlar aynı set primer ile amplifiye edilir (49, 53, 56).

Real-time PZR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç verebilen PZR sistemidir. PZR amplifikasyonu ve proba saptama aşamalarını birleştiren “Real-time” PZR sistemi, standart PZR yöntemlerine olan üstünlükleri ile PV-B19 tanısında da son yıllarda kullanılan moleküler testler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ticari olarak 3 tipi vardır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)’dır. Bu Real-time PZR çeşitleri, ardışık prob hibridizasyonu, 5’-ekzonükleaz problemleri gibi farklı yaklaşımlar ile geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Hızlı ve pratik olmasının yanı sıra yüksek duyarlılık ve kantitatif sonuç verebilme özellikleri ile Real-time PZR testleri günümüzde PV-B19 tanısında tercih edilen nükleik asit testleridir (5, 57). Genel olarak maternal PV-B19 enfeksiyonu şüphesi olan gebe kadınlarda ve klinik

bulgulara dayanılarak PV-B19 infeksiyonundan şüphelenen kişilerde, PV-B19 tanısı için genel olarak izlenecek algoritma şekil 2.5’de verilmiştir (5, 9, 48).



Şekil 2.5. Parvovirus B19 şüpheli kişilerde tanı için algoritma (5, 9, 48).

2.11. Tedavi

Parvovirus B19 enfeksiyona karşı spesifik bir antiviral ilaç yoktur fakat virusun elemine edilebilmesi için birkaç alternatif seçenek önerilmektedir. PV-B19 enfeksiyonu tedavisi seçiminde, immün yetmezlik durumu ve altta yatan hastalığa bağlı risk grupları ve gelişen farklı patogenezi içeren konak immünitesi ilgili faktörler asla göz ardı edilmemelidir (izelge 2.2). Immnokompetent hastalarda normalde enfeksiyon için tedaviye gerek yoktur, hastalık hafif ve kendini sınırlayan ateşli bir seyir izler (9). Eritema enfeksiyozum çoğunlukla kendini sınırlayan ateş ve döküntü ile karakterizedir ve çoğunlukla semptomatik tedavi gerektirmez. Ancak artropati için nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar semptomların azaltılmasında kullanılabilir (5, 9).

Semptomatik tedavi ve koruma kronik hemolitik anemi, immün yetmezliği olan hastalara ve bağışık olmayan gebeler için daha önemlidir. Kırmızı hücre yıkımı artmış veya üretimi azalmış kronik hemolitik anemili hastalarda akut enfeksiyon sonucu gelişen geçici aplastik kriz genellikle hastaneye yatış ve eritrosit transfüzyonu gerektirir. Zamanında müdahale edilmeyen geçici aplastik krizli hastalarda derin anemi sonucu ölüm gözlenebilir. Bu nedenle erken tanı ve destekleyici tedavi önemlidir (5, 58).

Nötralizan antikor eksikliği olan immün sistemi baskılanmış kişilerde, persistant PV-B19 enfeksiyonu tedavisi için intravenöz immünglobulin tedavisi fayda sağlamaktadır. Aynı zamanda kemoterapi alan hastalarda tedavinin geçici olarak kesilmesi sonucu antikor üretiminin artmasıyla viremi ya da enfeksiyonla ilişkili anemiye azaltabilir (5, 9). Yine solid organ transplantasyonu sonucu kullanılan immünsupresif ajanların azaltılması ve intravenöz immünoglobulin tedavisi PV-B19 enfeksiyonunun elemine edilmesine yardımcı olmaktadır (59). Immnsuprese hastalarda persistant PV-B19 enfeksiyonu sonucu oluşan kronik aneminin ortadan kaldırılmasında genellikle intravenöz immünoglobulin tedavisi daha başarılıdır (5, 9).

Parvovirus B19 tarafından indüklenen anemi, genelde hafif veya orta derecededir ve fetüs tarafından tolere edilmektedir. AĞır konjenital anemi sık olmasa da fetal hidropsa ve lme neden olmaktadır. AĞır konjenital anemi ultrasonografik bulgularla saptanmadıkça, fetal hemoglobin saptanması genellikle faydalı olmamaktadır. Doppler lmleri ile fetal orta serebral arterin tepe sistolik hızın saptanması, fetal aneminin saptanmasında en kullanışlı yöntemdir (58, 60). AĞır

konjenital anemiden kuşkulandığı zaman, fetus yakından izlenmeli ve fetal hematokritin perkütan umbilikal ven örneği ile bakılması gerekmektedir. Bulgular ağır konjenital anemiye gösteriyorsa, intrauterin fetal kan transfüzyonu yapılmalıdır. Ancak bu tedavi yönteminin kullanılmasında az da olsa bazı risk mevcuttur. Doopler ölçüm metodu ile noninvaziv olarak belirlenen konjenital anemi bu riski en aza indirmektedir. Fetüse intravenöz immünoglobulin tedavisinin yapıldığı çalışmalar mevcut olmasına karşın, kısıtlı veriler nedeniyle bu tedavi önerilmemektedir (5, 58).

Çizelge 2.2. Farklı risk grubu ve patogenezlere PV-B19 tedavisi için yaklaşımlar (9).

Risk Grubu	Önerilen Patogenez	Klinik ve Laboratuvar Belirtileri	Tedavi
İmmünokompetent kişiler	İmmün kompleks bozuklukları	Eritema infeksiyozum, artropati	Anti-inflamatuvar ilaçlar
Kırmızı hücre yıkımı artmış hastalar	Eritropoeizisin azalması	Geçici aplastik kriz	Kan transfüzyonu
İmmünyetmezliği olan hastalar	Humoral ya da hücreyel immün yanıt eksikliği	Kronik anemi	İntravenöz immünoglobulin terapi
Fetüsler	Humoral ya da hücreyel immün yanıt eksikliği Eritropoeizisin azalması	Hidrops fetalis, intrauterin fetal ölüm, konjenital anemi, kardiyak bozukluklar	Kan transfüzyonu, İntravenöz immünoglobulin tedavisi

2.12. Korunma

Lipid zarfın yokluğu ve sahip olduğu sınırlı DNA içeriği PV-B19'u, fiziksel (ısı, pH, solvent ve deterjanlar gibi) inaktivasyona oldukça dirençli kılmaktadır. Virus pH 3-9 değerleri arasında ve 56°C'de 60 dakika stabildir, lipid çözücüler etki göstermediğinden virus inaktivasyonunda başarısızdır (6, 8, 23). Bu nedenle PV-B19 ve onun gibi zarfsız olan hepatit A virusu, çözücü deterjanla işlem görmüş kan ürünlerinde yüksek düzeyde izole edilmişler ve infeksiyonlara neden oldukları gösterilmiştir (10). Hemofili hastalarına uygulanan trombosit ve kırmızı kan hücre transfüzyonu nedeniyle bu hastalar, PV-B19 infeksiyonu açısından risk taşımaktadır. Bu hastalar için rekombinant pıhtılaşma faktörlerinin kullanımı infeksiyon riskini azaltmaktadır. Bu gibi zarfsız viruslar, tekrarlanan dondurma çözme işlemine, formaline, beta-propiolaktone,

3'den asidik ortamlara ve 9'dan alkali ortamlara duyarlıdır. Virus eliminasyonunda bu yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (6, 8, 23).

Eritema infeksiyozumlu hastaların izolasyonuna gerek yoktur çünkü hastalığın semptomları ortaya çıkmadan önce infeksiyon bulaşıcıdır. Ancak geçici aplastik kriz ve kronik PV-B19 infeksiyonu bulunan hastalar infeksiyon süresince bulaştırıcıdırlar. Bu nedenle bu hastaların izolasyonu yapılmalı ve temas halinde koruyucu malzemeler giyilmelidir. Gebe personeller temastan kaçınmalıdır. PV-B19 spesifik IgG titresi yüksek olan bağışık kişilerin önlem almaya ihtiyacı yoktur (5, 6).

PV-B19 infeksiyonunun önlenmesi için şu ana kullanılmakta olan bir aşı yoktur. İdeal bir aşı, hem nötralizan antikor üretimine hem de T-hücre cevabına neden olabilmelidir. Virusa karşı geliştirilecek aşının hem VP1 hem de VP2 antijenlerini içermesinin immünizasyon için en uygun kombinasyon olacağı vurgulanmaktadır. VP1 kapsidin sadece %4'lük kısmını oluşturmasına rağmen virusa karşı güçlü nötralizan antikorların oluşmasında önemli yer tutar (61, 62).

Son zamanlarda VP1 ve VP2 proteinlerinin boş bir kapsid içerisinde kendi kendine bir araya getirilmesiyle elde edilen orjinal virus partikülüne benzeyen bir rekombinant insan PV-B19 aşısı faz 1 deneme aşamasındadır ve MF59C.1 adjuvanı ile formüle edilmiştir. Ballou ve ark. (63) tarafından 24 seronegatif gönüllüye aşı denenmiş ve çalışmaya katılan tüm gönüllülerde 2 doz aşı sonunda nötralizan PV-B19 seropozitifliği saptanmıştır (63). Aralık 2007 A.B.D.'nde, Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları ve Alerji Enstitüsü ise rekombinant PV-B19 aşısının immünojenisitesi ve güvenilirliği faz 1/2 çalışmalarını başlatmıştır (62).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasına, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 24.11.2010 tarih ve 2010/56 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı" alındıktan sonra başlanmıştır.

3.1. Hasta grubu kan örneklerinin toplanması

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Hematoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne 2011-2012 yılları içerisinde gelen kemoterapi alan ya da almayan yetişkin 100 hematolojik maligniteli hasta çalışmaya dahil edildi. Hasta grubunda bulunan hastalardan; 10 tanesine akut lenfoblastik lösemi (ALL), 31 tanesine kronik lenfoblastik lösemi (KLL), 25 tanesine akut miyeloid lösemi (AML), 25 tanesine kronik miyeloid lösemi (KML), 4 tanesine miyelodisplastik sendrom (MDS), 3 tanesine polistemia vera (PV), 1 tanesine THC'li lenfoblastik lenfoma ve 1 tanesine multipl miyelom (MM) klinik tanısı konmuştu. 50 erkek ve 50 kadından oluşan hasta grubunda yaş ortalaması ise 54,8 olarak belirlendi.

3.2. Kontrol grubu kan örneklerinin toplanması

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne 2011 yılının Haziran ve Ağustos aylarında gelen, yaş ortalaması 36,34 olan, 2'si kadın 102'si erkek, parenteral taşınan hastalıklar bakımından hiçbir risk faktörüne sahip olmayan ve bağışçı tarama testleri negatif toplam 104 kan bağışçısı çalışmaya dahil edildi.

Hem hasta hem de kontrol grubu için içerisinde antikoagülan olarak EDTA içeren steril 10 ml'lik tüplere alınan tam kan örnekleri, 5.000 devir/dakika (d/d)'da 3 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki plazma ve "buffy coat"(lökositce zengin bölge) kısmından ikişer tane olacak şekilde 1,5 ml'lik plastik tüplere ayrıldı. Toplanan örnekler çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Görüntü yazıcısı (Sony Digital Graphic Printer Up D-897)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)
- Mikrosantrifüj (Sigma 1-15)
- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve- OT 020)
- Hassas Terazî (Scaltec)
- Buz Dolabı (Indesit)
- Vortex (NM- 110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson- PİPETMAN- P 10-P100-F1000)

3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema- 302430300, cat nr 30354)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck- L51736210)

- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck- K29935665 204)
- Etidyum bromid
- Brom fenol mavisi (SCP Science-B7722)
- Süktroz (Merck–1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221)
- Fenol (Merck- S3971900 349)
- Kloroform (Merck- K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A–9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Promega-M1665)
- 10X PZR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
- 5 mM MgCl₂ (Promega- A351H)
- 10 mM dNTP Mix (Sigma-Deoxynucleotide set DNTP–100)
- Proteinaz K (Sigma- P 2308)
- 100 bç Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega- G6951)
- Distile Su
- DNase, RNase Free Su
- Primerler

Parvovirus B19 için:

Sense: B19V-1 (5'-CAGTTATCTGACCACCCCATGC-3')

Antisense: B19V-2 (5'-AGTTGGCTATACCTAAAGTCAT-3')

3.3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.3.3.1. DNA Safılaştırılması (Ekstraksiyonu) İçin Kullanılan Solüsyonlar

Lysis Buffer (100 ml için)

(10mM Tris/HCl pH 8; 5mM EDTA, % 0,5 SDS)

- Tris-HCl.....0,209 gr.
- EDTA.....0,249 gr.
- SDS.....0,67 gr.
- Tartılan kimyasal maddeler 50 ml distile su ile eritildi.
- pH'sı 8,0'a ayarlandı.
- 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

1:1 Fenol-Kloroform

- Kristalize fenol su banyosunda eritildi.
- Bir kısım kloroform, bir kısım sıvı hale getirilmiş fenol ile karıştırıldı.
- + 4°C'de koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

Proteinaz-K (100mg/ml)

- Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg Proteinaz-K (Sigma)
- 1 ml steril distile su ile çözölerek 100 mg/ml'lik konsantrasyona getirildi.
- 50 µl'lik porsiyonlara ayrıldı.
- -20°C'de saklandı.

3.3.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8

- Tris Base.....108 gr.
- Borik Asit.....55 gr.
- EDTA.....8,3 gr.

- Distile su ile eritildi ve pH'sı 8,8'e ayarlandı.
- Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak çözüldü.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)

- 10X TBE Buffer stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı.

Yükleme Tamponu (20 ml için)

- Sükroz.....4 gr.
- Brom fenol mavisi.....0,05 gr.

- Tartılan kimyasallar 20 ml 1XTBE tamponunda eritildi.
- Oda ısısında saklandı.

% 2 Agarose Gel Solüsyonu

- 30 ml 1X TBE Buffer içerisinde 0,6 g agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra Et-Br ilave edildi.

3.4. DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden DNA saflaştırılması; modifiye klasik fenol-kloroform ve kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (64).

3.4.1. DNA Ekstraksiyonunun Yapılışı

- 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpüne, 100 µl serum örneği kondu.
- Serum örneği üzerine 300 µl lysis tamponu (10mM Tris/HCl pH 8,0; 5mM EDTA, % 0,5 SDS) + 1 µl Proteinaz-K (100mg/ml) ilave edip vorteks ile karıştırıldı.
- Bu karışım, 56°C'lik su banyosunda bir gece boyunca inkübe edildi.
- Bu karışım üzerine 800 µl fenol-kloroform ilave edildi. İyice alt üst edip +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı (üstteki berrak kısım) alınarak yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Yeni tüpe alınan süpernatant üzerine, süpernatantın 2 katı hacimde olacak şekilde kloroform ilave edildi. Alt üst ederek +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı alınıp yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 1 ml soğuk absolüt etanol ilave edildi.
- Yavaşça alt üst edip -20°C'de gece boyunca bekletildi.
- Ertesi gün tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün dibindeki nükleik asit pellet kısmına zarar vermeden üst kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak koyarak 10 dakika bekletilerek kurutuldu.
- Pellet 20 µl steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yaparak çözdürüldü. Hazırlanan ekstrakt çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

3.5. Moleküler Analiz

3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Parvovirus B19 DNA'ları spesifik primer dizileri ve reaksiyon parametreleri, Sifakis ve ark. (65) tarafından yapılan bir araştırma makalesinden seçildi ve PZR PV-B19 amplikasyonu için modifiye edildi. PV-B19 için kullanılan primerler çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Parvovirus B19'un PZR ile belirlenmesinde kullanılan primerler (65).

Primer Adı	Primer Dizisi	PZR Ürünü
B19V-1	(5'-CAGTTATCTGACCACCCCATGC-3')	350 bç
B19V-2	(5'-AGTTGGCTATACCTAAAGTCAT-3')	

Amplifikasyon için ise plazmadan ekstrakte edilen DNA dizilerini kullanıldı. PV-B19 için PZR reaksiyon şartları çizelge 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3.2. PV-B19'un PZR reaksiyon karışımları (65).

	PV-B19
Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (µl)
Distile Su	35,2
10X PZR Buffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (Forward) (100pmol/µl)	0,25
Primer 2 (Reverse) (100pmol/µl)	0,25
Taq DNA Polimeraz	0,30
DNA örneği	5
Toplam Hacim	50
PV-B19 için; Primer 1 Primer 2	B19V-1 (5'-CAGTTATCTGACCACCCCATGC-3') B19V-2 (5'-AGTTGGCTATACCTAAAGTCAT-3')

Oluşturulan bu PZR karışımı vorteksle karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine 45'er µl konuldu. Daha sonra üzerine 5 µl DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi. PV-B19 için thermal cycler cihazında PZR koşulları çizelge 3.3'deki gibi uygulandı.

Çizelge 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri (65).

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	45 sn	40
Primer bağlanması (Annealing)	58	45 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	45 sn	
Son uzama (Post elongasyon)	72	10 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

3.5.2. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100–1000 bp) DNA fragmentleri ihtiva eden moleküler ağırlık standartları ile kıyaslanarak saptandı.

Tank tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

3.5.2.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Bir balon jodede 0,5 gr agaroz 50 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra Et-Br'den 5 µl eklendi. Erimiş haldeki Et-Br ile karıştırılmış jel tarakların yerleştirildiği jel

tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi sırasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakılan jel, soğuma sırasında Et-Br'ün ısı ve sıcaktan çabuk etkilenmesi ve aktivitesini yitirmesi nedeniyle, gün ışığından korundu. Katılaşıma kadar (25–30 dk) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 7'şer µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1XTBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30–40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jeli tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) kayıtları yapıldı.

3.5.3. Parvovirus B19'un Varlığının Tespiti

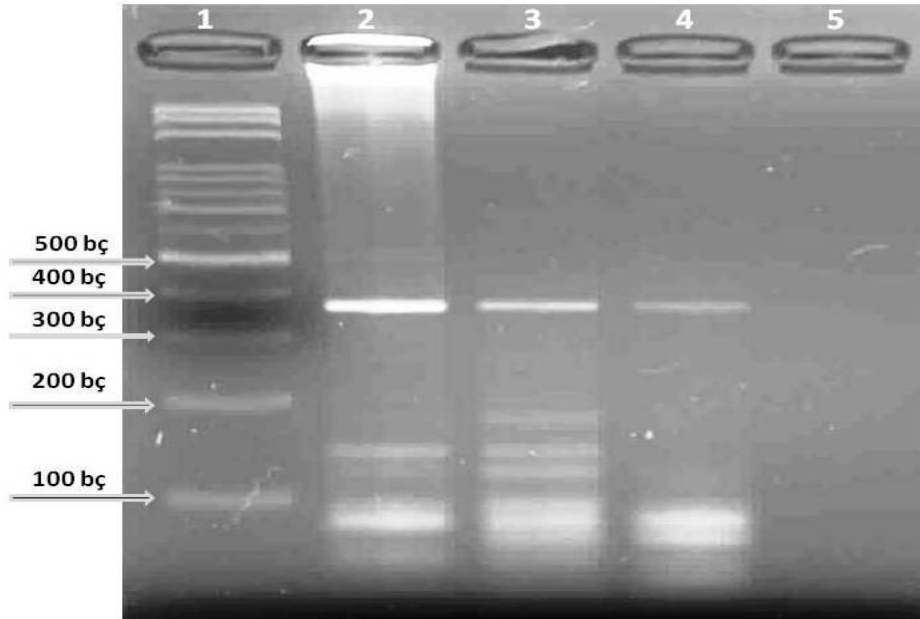
Agaroz jel elektroforez işleminden sonra, 300 ve 400 bp'lik DNA moleküler ağırlık standardının arasında yer alan bantlar gözlemlenmektedir. Bu nedenle PV-B19'a spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde yaklaşık 350 bp hizasında bulunan bantlar PV-B19 olarak değerlendirildi.

3.5.4. İstatiksel Analiz

Çalışmanın bulguları istatistik analiz ile değerlendirilmiştir. MedCalc v.11.5.1 programı ile hasta ve kontrol grubunun pozitiflik ve negatiflik oranlarının karşılaştırılması yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Yaptığımız bu çalışmada 100 hematolojik maligniteli hastadan toplanan plazma örneklerindeki PV-B19 viremişi PZR tekniği ile araştırıldı. Kan bağışçılarında elde edilen 104 plazma örneği kontrol grubu olarak kullanıldı. Hematolojik maligniteli hastalarda; PV-B19 viremisinin prevalansı %20 (20/100) olarak saptandı. Kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen kan bağışçılarında, PV-B19 viremisinin prevalansı %7,69 (8/104) olarak saptandı. Kontrol grubu ile hematolojik maligniteli hastaların oluşturduğu gruptaki PV-B19 pozitiflikleri karşılaştırıldığında önemli bir farklılık gözlemlendi ($p=0,017$) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. PZR yöntemiyle belirlenen PV-B19 DNA'sının, %1,5'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Kolon 1; 100 bç'lik DNA step ladder (moleküler ağırlık standartı),

Kolon 2, 3 ve 4; PV-B19 primer çifti ile çoğaltılan 350 bç'lik PV-B19 pozitif örnek,

Kolon 5; PV-B19 negatif örnek.

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarındaki PV-B19 pozitifliği ve iki grup arasındaki farklılık

Çalışma grubu	Sayı	PV-B19 PZR pozitif	p değeri
Hasta grubu	100	20 (%20)	0,017
Kontrol grubu	104	8 (%7,69)	

Hematolojik maligniteli hastalar, PV-B19 viremisi açısından incelendiğinde prevalans; ALL’li hastalarda %1 (1/100), KLL’li hastalarda %10 (10/100), AML’li hastalarda %3 (3/100), KML’li hastalarda %5 (5/100) ve PV’lı hastalarda %1 (1/100) olarak saptandı. Aynı hasta gruplarında bulunan PV-B19 viremisi prevalansı ise; ALL’li hastalarda %10 (1/10), KLL’li hastalarda %32,25 (10/31), AML’li hastalarda %12 (3/25), KML’li hastalarda %20 (5/25) ve PV’lı hastalarda %33,33 (1/3) olarak saptandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Hematolojik maligniteli hasta gruplarında PV-B19 pozitifliği ve prevalansı

Hasta grubu	Sayı	PV-B19 pozitif	Toplam (n=100)
ALL	10	1 (%10)	1 (%1)
KLL	31	10 (%32,25)	10 (%10)
AML	25	3 (%12)	3 (%3)
KML	25	5 (%20)	5 (%5)
Polisitemia vera	3	1 (%33,33)	1 (%1)
Multipl myelom	1	0 (%0)	0 (%0)
Myelodisblastik Sendrom	4	0 (%0)	0 (%0)
THC’li Lenfoblastik Lenfoma	1	0 (%0)	0 (%0)

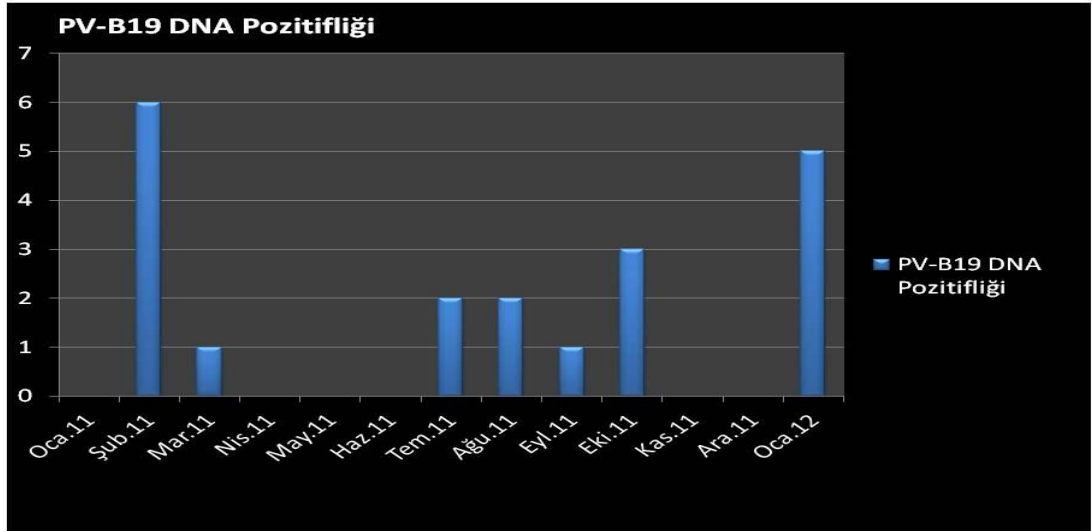
Lösemili hasta grupları akut (ALL ve AML) ve kronik (KLL ve KML) olarak ikiye ayrıldığında ve bu iki grup toplam lösemili hastalara (n=91) oranlandığında; akut lösemili grupta 4 (%4,4), kronik lösemili grupta ise 15 (%16,48) PV-B19 DNA pozitifliği saptandı. Bu iki grup pozitiflikleri toplam lösemili hastalara oranlandığında kronik lösemili grup ve akut lösemili grup arasında anlamlı bir fark tespit edildi (p=0,0153) (Çizelge 4.3).

PV-B19 DNA pozitif hastalardan 2 AML hastası ve 1 KLL hastası hayatını kaybetmiştir. PV-B19 PZR pozitif hastaların; 13'ü erkek, 7'si kadın iken, yaş ortalamaları 59,5 olarak saptandı. PV-B19 PZR pozitif sağlıklı kan bağışçılarının hepsi erkek ve yaş ortalamaları 36,25 olarak saptandı.

Çizelge 4.3. Kronik lösemili hastalardaki PV-B19 PZR pozitifliğinin, akut lösemili hastalardaki pozitiflik ile karşılaştırılması

Çalışma grubu	Hasta Sayı	PV-B19 PZR pozitif	p değeri
Akut lösemili grup	35	4 (%4,4)	0,0153
Kronik lösemili grup	56	15 (%16,48)	
Toplam Lösemili Hasta	91	19 (%20,88)	

Parvovirus B19'un tepe insidansı, ılıman iklimlerde çoğunlukla kış sonu ve bahar başındaki aylarda mevsimsel çeşitlilik gösterir ve 4 yılda bir epidemik pik yapabilir (8). Bizim yaptığımız çalışmada PV-B19 DNA pozitifliği, yıl boyunca toplanan kan örneklerinde Ocak-Mart ayları arasında 12 ve Temmuz-Ekim ayları arasında toplanan kan örneklerinde 8 olarak saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hasta grubunda PV-B19 pozitifliğinin aylara göre dağılımı.

5. TARTIŞMA

Parvovirus B19 *Parvoviridae* familyasının *Erytrovirus* genusunda yer alan, küçük bir DNA virusudur. Son zamanlara kadar insanlarda hastalık oluşturan tek parvovirus olduğu düşünülen PV-B19 dışında, 2005 yılında İsveçli araştırmacılar tarafından solunum yolu örneklerinde saptanan ve *Bocavirus* genusu içine dahil edilen *Human Bocavirus* ve yine son virus keşifleri ile ilk olarak insan serumunda tanımlanmış henüz sınıflandırılmamış *Human Parvovirus 4*'ün de insanlarda hastalık oluşturabilecekleri tespit edilmiştir (1, 2, 66). PV-B19 tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Esas olarak solunum yolu sekresyonları ile bulaşan virus, kan ve kan ürünleri nakli ve transplasental yol ile de geçebilmektedir. PV-B19 enfeksiyonu sıklıkla okul çağı (5-15 yaş) çocuklarında görülse de tüm yaş gruplarında görülebilir (1).

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda persistant ve akut PV-B19 enfeksiyonunun klinik tablosu immünokompetent kişilerden önemli derecede farklıdır. Humoral ve/veya hücre sel immün yanıt eksikliğinde enfeksiyon, kronik anemi ile kendini gösteren persistant kemik iliği süpresyonuna neden olabilir. İmmün yetmezliğe neden olan predispozan koşullar; konjenital immün yetmezlikler, lösemi, lenfoma, miyelodisplastik sendrom, kemik iliği ve solid organ transplantasyonu, kemoterapi ve insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile enfekte olmayı içermektedir (9). Çoğu immün yetmezlikli hastada, kronik anemi ile ilişkili persistant enfeksiyonlarda; virusa karşı üretilen nötralizan antikorların üretimi etkilenmektedir (8, 9).

Hematolojik maligniteli hastalarda, kemoterapi alan çocukların %10'u ve yetişkin hastaların %5 kadarında PV-B19 enfeksiyonu aşırı hatta letal sitopenilerle sonuçlanır ve bu hastalar virus ile persistant olarak enfekte dirler (9). Lösemili yetişkin ve pediatrik hastaların çoğunda görülen immün sistemin baskılanması kronik PV-B19 enfeksiyonu neden olmaktadır (18).

Hematolojik maligniteli hastalar üzerine yapılan PV-B19 çalışmalarının çoğu akut lösemili çocuk hastalarda yapılmıştır. Yetişkin hematolojik maligniteli hastalarda yapılan çalışmalar ya da yapılacak çalışmalarda veri olarak PV-B19 prevalansı açısından çok büyük önem arz etmektedir. Çünkü PV-B19 enfeksiyonu, çocuk ya da yetişkin olsun tüm hematolojik maligniteli hastaların prognozuna da büyük etkiler

göstermektedir. Bir grup akut lösemili çocukta, istenilmeden kesilen kemoterapinin gün sayısı parvovirus ile infekte olanlarda, zayıf prognoz ile ilişkili olan infekte olmayan kişilerden önemli derecede daha yüksektir. PV-B19 infeksiyonunun erken tanısı bu nedenle oldukça önemlidir ve erken dönemde infeksiyon ya kan transfüzyonu ya da intravenöz immünoglobulin uygulaması ile tedavi edilebilmektedir (9). Bu nedenle hematolojik maligniteli hasta gruplarında bu virusun göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Dolayısıyla bu hasta gruplarında yapılacak PV-B19 prevalans çalışmaları, hem veri akışı hem de bu hasta gruplarındaki önemini ortaya koymada önem arz etmektedir. Biz de buradan yola çıkarak yaptığımız bu çalışmada PV-B19 spesifik primerleri kullanarak PZR metodu ile hematolojik maligniteli hasta gruplarında PV-B19 prevalansını araştırdık.

Yaptığımız çalışmada 100 hematolojik maligniteli hastadan toplanan plazma örneklerindeki PV-B19 viremisi PZR tekniği ile araştırıldı. Kan bağışçılardan elde edilen 104 plazma örneği kontrol grubu olarak kullanıldı. Hematolojik maligniteli hastalarda; PV-B19 viremisinin prevalansı %20 (20/100) olarak saptandı. Kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen kan donörlerinde, PV-B19 viremisinin prevalansı %7,69 (8/104) olarak saptandı. Kontrol grubu ile hematolojik maligniteli hastaların oluşturduğu gruptaki PV-B19 pozitiflikleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık elde edildi ($p=0,017$). Elde edilen bu anlamlı farklılık hematolojik maligniteli hastaların sağlıklı bireylere oranla PV-B19'un daha yüksek oranda risk faktörü olduğunun bir göstergesidir.

2007 yılında İsveç'te Lindblom ve ark. (11) tarafından yapılan çalışmada, 117 ALL çocuk hastadan alınan kemik iliği hücrelerinde PZR metodu ile PV-B19 araştırılmıştır. Bu hastaların 86'sının tanısı yeni konmuş iken 31 hastanın hastalığının son fazında olduğu belirtilmiştir. PV-B19 DNA pozitifliği 18/117 (%15) olarak bulunmuş ve klinik olarak yapılan araştırmalar PV-B19 kaynaklı sitopeniler nedeniyle kemoterapide uzun süreli kesintiler meydana geldiği sonucuna varıldığı belirtilmiştir.

Zaki ve ark. (43) tarafından 2009'da yapılan bir çalışmada kemoterapi alan ve henüz tanısı yeni konmuş akut lösemili hastalar sırasıyla Grup 1 ve Grup 2 olarak iki ana gruba bölünmüş ve PV-B19 hem EIA hem de PZR metodları ile araştırılmıştır. Bu hastalarla karşılaştırılmak için 20 sağlıklı gönüllü kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Grup 1'deki 45 hastada IgM pozitifliği 14 (%31,1), IgG pozitifliği 18 (%40) ve PV-B19 DNA

pozitifliği 10 (%22,2) olarak belirtilmiştir. Grup 2'deki 40 hastada ise IgM pozitifliği 20 (%50), IgG pozitifliği 16 (%40) ve PV-B19 DNA pozitifliği 18 (%45) olarak belirtilmiştir. Kontrol grubundaki 20 sağlıklı kişide PV-B19 tespit edilmediği belirtilmiştir.

Jitschin ve ark. (67) tarafından kantitatif PZR ve ELISA tanı metodları kullanılan bir çalışmada, hematolojik ve onkolojik rahatsızlığı bulunan çocuk hastalarda PV-B19 infeksiyonunun sıklığının tanımlanması ve etkileri araştırılmıştır. Çalışmaya otoimmün hastalıklar ve hematolojik bozuklukları bulunan non-malignant (n=27), lösemi ve solid tümörleri bulunan malignant (n=68), yüksek ateş gibi semptomları bulunan diğer rahatsızlıkları (n=15) içeren 110 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalarda IgM pozitifliği 5/110 (%4,5), IgG pozitifliği ise 48/110 (%43,6) olarak belirtilmiştir. PV-B19 DNA pozitifliği ise 22/110 (%20) olarak belirtilmiştir. Bu 22 pozitifliğin hasta grupları olarak; lösemide 5/31, non-Hodgkin lenfomada 2/9, solid tümörlerde 6/25, otoimmün hastalıklarda 4/14, hematolojik hastalıklarda 4/13 ve yüksek ateşde 1/15 PV-B19 DNA pozitifliğinin oluşturduğu belirtilmiştir.

2004 yılında Mısır'da, El-Mahallawy ve ark. (68) tarafından persistant anemili 50 ve anemi olmayan kemoterapi alan 34 ALL hastasında, PV-B19 infeksiyonunun bu hasta grubunda anemi ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu hastalardan alınan serum örneklerinde ELISA ile IgM ve IgG antikorları ve alınan kemik iliği aspiratlarında ise nested PZR ile PV-B19 DNA varlığı araştırılmıştır. Anemili lösemili hasta grubunda 11/50 (%22) ve kontrol grubu olan anemi olmayan lösemili hasta grubunda ise 2/34 (%5,9) PV-B19 DNA pozitifliği saptandığı belirtilmiştir. Anemili lösemili hasta grubunda 20/50 ve anemi olmayan lösemili hasta grubunda ise 4/34 IgM+DNA pozitifliği saptandığı belirtilmiştir. Bu değerler iki grup arasında karşılaştırıldığında sırasıyla hem DNA hem de IgM+DNA pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık saptandığı belirtilmiştir (p=0,03 ve p=0,01). Sonuç olarak kemoterapi alan anemili hastalarda saptanan anlamlı farklılığın, PV-B19'un akut infeksiyon sırasında anemiye neden olduğunun bir kanıtı olabileceği belirtilmiştir.

Soliman ve ark. (69) tarafından 2008'de kemoterapi alan 39'u akut lösemili ve 20'si solid tümörlü 59 çocuk hastada PV-B19 varlığı ELISA ve PZR tanı yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak 30 sağlıklı çocuk karşılaştırma yapmak için çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunda PV-B19 DNA pozitifliğinin 16/59

(%27,1), IgM pozitifliğinin 3/59 (%5,1) ve IgG pozitifliğinin 36/59 (%61) olarak saptandığı belirtilmiştir. Kontrol grubunda ise PV-B19 DNA ve IgM pozitifliği saptanmaz iken IgG pozitifliğinin 18/30 (%60) olarak saptandığı belirtilmiştir. Bu oranlar karşılaştırıldığında hasta grubu ile kontrol grubu arasında PV-B19 DNA pozitifliği açısından anlamlı bir farklılık saptandığı belirtilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışma grubu yetişkin hematolojik hasta grubu olmasına rağmen çocuk hematolojik hasta gruplarında yapılan yukarıdaki çalışmalarda elde edilen PV-B19 DNA pozitiflikleri bizim elde ettiğimiz 20/100 (%20) DNA pozitifliğine çok yakın değerlerdedir.

Ülkemizde 2007 yılında İstanbul'da Us ve ark. (70) tarafından yapılan bir çalışmada hematolojik bozuklukları olan yetişkin 79 kişi çalışmaya dahil edilmiş ve ELISA ve PZR teknikleri kullanılarak bu hastalarda PV-B19 varlığı araştırılmıştır. Hasta grubunu; yaş ortalaması 36 olan akut (n=22) ve kronik (n=22) lösemi, malignan lenfoma (n=18), hemolitik anemi (n=2), miyelodisplastik sendrom (n=6) ve multiple myeloma (n=11) hastaları oluşturmakta olup hastaların çoğunluğunun immünosupresif tedavi aldığı ve çoklu kan transfüzyonu yapıldığı bildirilmiştir. Bu hastalarda yalnızca PV-B19 DNA pozitifliği 4/79 (%5,06), hem IgM hem de PV-B19 DNA pozitifliği 7/79 (%8,86), yalnız IgM pozitifliği 3/79 (%3,79), hem IgG hem de PV-B19 DNA pozitifliği 9/79 (%11,39) ve yalnızca IgG pozitifliği 32/79 (%40,5) olarak belirtilmiştir. Sonuçlar yorumlandığında toplamda 23/79 (%29,1) kişi PV-B19 ile infekte olduğu kanısına varılmıştır. PV-B19 DNA pozitifliği ise 20/79 (%25,31) olarak belirtilmiştir. Akut lösemili hastalarda PV-B19 DNA pozitifliği 3/22 (%13,63) iken ve kronik lösemili hastalarda PV-B19 DNA pozitifliği 7/22 (%31,81) olarak belirtilmiştir.

MDS, AML ve ALL gibi hastalıklar klonal kök hücre hastalıklarıdır. Bu hastalıkların patogenezi tamamen aydınlatılamamıştır. Bunların gelişmesi ve ilerlemesinde mutasyonlar ve epigenetik olaylar önemli bir rol oynayabilir. DNA metilasyonu insanlarda epigenetik modifikasyonların sıklıkla başında gelmektedir (45, 46, 47). HBV, HCV, HPV, EBV, HTLV-1 ve HHV-8 gibi birçok virus kanserle ilişkilendirilmiştir. Örneğin; hepatokarsinomaya neden olabilen HBV ve HCV P16^{INK4A} metilasyonu gibi bazı metilasyon çeşitleri ile ilişkilendirilmiştir. P15^{INK4B} ve onun fonksiyonel homoloğu olan P16^{INK4A} siklin-bağımlı kinazlar 4 ve 6 yoluyla hücre döngüsünü inhibe eder ve G1'den S fazına geçişi düzenler. P15^{INK4B} promoter

metilasyonu geni bastırır ve böylece hematopoyetik hücrelerin hiperpoliferasyonunu sağlar. Birçok araştırmacı P15^{INK4B} gen inaktivasyonunun lökomogenezde önemli bir rol oynayabileceğini düşünmektedirler (46).

Ülkemizde Mersin bölgesinde 2007 yılında bu düşünceden yola çıkan Yalçın ve ark. (46) hematolojik maligniteli hastalarda EBV ve PV-B19 infeksiyonunun P15^{INK4B} promoter metilasyonu ile bir ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya 13 MDS, 26 AML ve 6 ALL hastasını içeren 45 yetişkin hematolojik maligniteli hasta ve non-malignant sağlıklı 18 kişi dahil edilmiştir. Hastalardan alınan kemik iliği hücrelerinde PZR ile EBV ve PV-B19 DNA varlığı araştırılmış ve P15^{INK4B} promoter bölgesinde metilasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak da elde edilen virus DNA pozitifliği ile P15^{INK4B} promoter metilasyonu arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. 45 hastanın 31'inde P15^{INK4B} metilasyonu (%68,88) tespit edildiği belirtilirken, kontrol grubu 18 non-malignant kişide 8 P15^{INK4B} metilasyonu tespit edildiği belirtilmiştir. 45 hastada PV-B19 DNA 31 (%68,88), EBV DNA 14 (%31,12) olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Kontrol grubunda ise PV-B19 DNA 8 (%44,44), EBV DNA 9 (%50) olarak tespit edildiği belirtilmiştir. AML ve ALL'yi içeren akut lösemili grupta (n=32) PV-B19 DNA 21 (%65,62), EBV DNA 10 (%31,25) olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Yine akut lösemili grupta P15^{INK4B} metilasyonu 25 (%78,12) olarak tespit edildiği belirtilmiştir. P15^{INK4B} metilasyonu için tüm hasta grupları (n=45) ve kontrol grubu (n=18) arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen p değeri sınırına oldukça yakın olduğu belirtilmiştir (p=0,071). Ancak akut lösemilileri oluşturan hastalar (n=32) ve kontrol grubu (n=18) arasında anlamlı bir farklılık (p<0,05, p=0,016) tespit edildiği belirtilmiştir. Tüm hasta grubunda PV-B19 DNA ve P15^{INK4B} metilasyonu arasında bir anlamlılık ilişkisi bulunamazken, p değeri yine anlamlılık sınırına oldukça yakın (p=0,074) olarak bulunduğu belirtilmiştir. Diğer yandan akut lösemili grupta (n=32) P15^{INK4B} metilasyonu ve PV-B19 DNA arasında anlamlılık ilişkisi bulunduğu belirtilmiştir (p<0,05, p=0,013). EBV DNA ve P15^{INK4B} metilasyonu arasında anlamlılık yönünden hem tüm hasta grubu hem de akut lösemili grupta inceleme yapılmış ve kayda değer bir farklılık elde edildiği belirtilmiştir. Kontrol grubunda da ise hem PV-B19 DNA hem de EBV DNA'sı ile P15^{INK4B} metilasyonu arasında anlamlılık ilişkisi bulunmadığı belirtilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada yetişkin hematolojik maligniteli hasta grubunda PV-B19 DNA pozitifliği, Us ve ark. (70) ve Yalçın ve ark. (46) tarafından yetişkin hematolojik maligniteli hasta gruplarında yapılan çalışmalardaki PV-B19 DNA pozitifliği ile karşılaştırıldığında farklılıklar gözlemlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada B19 DNA pozitifliği hematolojik maligniteli grupta 20/100 (%20) iken, Us ve ark. (70) tarafından yapılan çalışmada 20/79 (%25,31), Yalçın ve ark. (46) tarafından yapılan çalışmada 31/45 (%68,88) olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Bu farklılığın bizim çalışma grubundaki hasta sayısının daha yüksek olmasından kaynaklandığı ya da çalışılan materyalden kaynaklanabileceği kanısındayız. Çünkü Us ve ark. (70) tarafından yapılan çalışmada serum örnekleri kullanılmışken, Yalçın ve ark. (46) çalışmada kemik iliği hücrelerini materyal olarak kullanmışlardır. Biz çalışmamızda plazmayı materyal olarak kullandığımızda 20/100 (%20) B19 DNA pozitifliği bulduk ve bu değer serum örnekleri ile çalışan Us ve ark. (70) tarafından tespit edilen 20/79 (%25,31) B19 DNA pozitifliğine oldukça yakındır. Aynı zamanda PV-B19 infeksiyonunun tepe insidansı her 3-4 yılda bir değişmektedir. Bu nedenle de çalışmalarda elde edilen sonuçlarda farklılıkların olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Kronik lösemili hastalarda humoral veya hücrel immün yanıt eksikliği nedeniyle persistan PV-B19 infeksiyonu oranı artmaktadır ve bu durum kronik anemi ile kendini gösteren persistant kemik iliği supresyonuna neden olabilmektedir (9). Us ve ark. (70) tarafından yapılan çalışmada tüm lösemili hastalara göre akut lösemili hastalarda PV-B19 DNA pozitifliği 3/44 (%6,81) iken ve kronik lösemili hastalarda PV-B19 DNA pozitifliği 7/44 (%15,9) olarak belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise lösemili hasta grupları akut (ALL ve AML) ve kronik (KLL ve KML) olarak ikiye ayrıldı. Bu iki grup toplam lösemili hastalara (n=91) oranlandığında bu oranlar Us ve ark.'nın (70) çalışmalarında belirtilen oranlara yakın olarak ; PV-B19 DNA pozitifliği akut lösemili grupta 4 (%4,4), kronik lösemili grupta ise 15 (%16,48) olarak saptandı. Ayrıca yaptığımız çalışmada bu iki grup pozitiflikleri tüm lösemili hastalara oranlandığında kronik lösemili grup ve akut lösemili grup arasında anlamlı bir fark tespit edildi (p=0,0153). Bu veriler kronik lösemili hastalarda persistant PV-B19 infeksiyonunun varlığının bir göstergesi olabilir.

Parvovirus B19'un tepe insidansı, ılıman iklimlerde çoğunlukla kış sonu ve bahar başındaki aylarda mevsimsel değişiklikler gösterir (8). Bizim yaptığımız

çalışmada PV-B19 enfeksiyonu ile mevsimsellik açısından bir bağlantı kurmak istediğimizde Ocak-Mart ayları arasında toplanan kan örneklerinde 12 PV-B19 DNA pozitifliği saptanmışken, diğer 8 PV-B19 DNA pozitifliği ise Temmuz-Ekim ayları arasında toplanan kan örneklerinde saptanmıştır.

Bunlara ek olarak, kan donörlerinde PV-B19 pozitifliğinin 1/167-1/35.000 değerlerinde olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (71, 72). PV-B19 enfeksiyonunun transfüzyon ile geçtiği bilinmesine rağmen, transfüzyonla ilişkisi hakkındaki çalışmalar geniş popülasyonları içermediği için yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla geniş popülasyonları içeren çalışmalara olan ihtiyaç artmaktadır ve elde edilecek veriler kısmen de olsa büyük önem arz etmektedir.

Hematolojik maligniteli hastalar sıklıkla kan ürünleri transfüzyonuna ihtiyaç duymaktadırlar ve PV-B19'un kan ve kan ürünleri yoluyla bulaşabildiği bilinmektedir. PV-B19 enfeksiyonu sonucu ise bu hasta gruplarında aşırı sitopeniler hatta letal pansitopeni görülebilmektedir. Buradan yola çıkarak Plentz ve ark. (73) tarafından yapılan bir çalışmada 6 ay süresince hematolojik servis hastalarına verilen toplam 2123 kan ürünü PV-B19 varlığı açısından in-house Real-time PZR (TaqMan) metodu ile taranmıştır. Aynı zamanda PV-B19 DNA pozitifliği saptanan kan ürünlerini alan hastalarda serolojik olarak PV-B19 antikorları ve PZR ile PV-B19 DNA varlığı araştırılmıştır. 2123 kan ürününün 21 (%1)'inde PV-B19 DNA pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Bu pozitiflik en çok allogenik periferik progenitor hücre ürünlerinde (%17,6) tespit edilmiştir. Bu PV-B19 DNA pozitif ürünleri alan 114 hasta tespit edilmesine rağmen, sadece 14 (%12)'ünde PV-B19 DNA tespit edildiği belirtilmiştir. Ancak bu hastalarda düşük bir viremi gözlemlenmesine rağmen, akut PV-B19 enfeksiyonunun semptomları gelişmediği belirtilmiştir. PV-B19 VP2 spesifik IgG bu 13 hastada transfüzyon öncesi pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak %1 oranında PV-B19 DNA pozitif olan kan ürünleri ile tedavi gören hastalardan %12'sinde PV-B19 DNA pozitifliği saptanmasına rağmen, semptomatik enfeksiyonun görülmediği kanısı çıkarılmıştır. Diğer taraftan Satake ve ark. (74) tarafından 2010 yılında yapılan geçmişe yönelik bir çalışmada 1999-2008 yılları arasındaki serolojik ve PZR ile PV-B19 taraması yapılan kan bağışçılarından PV-B19 transfüzyon bulaşının mümkün olabileceğine dair klinik verilerin olduğu bildirilmiştir. Sekiz hastanın PV-B19 kontamine kan transfüzyonu nedeniyle PV-B19 pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Bu

hastaların dördünde anemi ve kırmızı hücre aplazisi olduğu belirtilirken, birinde ise pansitopeni geliştiği belirtilmiştir. Bu beş hastanın altta yatan hastalıklarının ise hem hematolojik malignite hem de hemolitik hastalıklar olduğu belirlenmiştir. PV-B19 pozitifliği bulunan 8 hastanın 5'inde sekans benzerliği ilişkisi nedeniyle kan bağışçısı kaynaklı bulaş tespit edilmiştir. Bu 8 hastada PV-B19 spesifik IgG ve IgM pozitifken, 5 hastada transfüzyon öncesi negatif olan hem PV-B19 spesifik IgG ve IgM hem de PV-B19 DNA'nın pozitif bulunduğu belirtilmiştir. Bu 5 hastada akut infeksiyon semptomları (retikülositopeni, kırmızı hücre aplazisi, yüksek ateş gibi) gözlemlendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada kan transfüzyonu ile bulaş sonucunda semptomatik infeksiyonun gelişebileceği vurgulanmıştır (74). Bu iki çalışmada göze çarpan durum Plentz ve ark. (73) tarafından yapılan çalışmada PV-B19 pozitif olan 14 hastanın 13'ünde transfüzyondan önce PV-B19 VP2 spesifik IgG antikorlarının pozitif bulunmasıdır. Bağışık olan bu hastalarda akut semptomlar görülemeyebilmektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise kan bağışçılarında PV-B19 prevalansı 8/104 (%7,69) olarak saptanmıştır. Bu değer kan bağışçılarında hematolojik bozukluğu bulunan hastalara verilecek olan kan ürünlerinde yapılan çalışmalara göre göreceli olarak riskler doğurmaktadır. Bu nedenle kan bağışçılarında yapılacak PV-B19 prevalans çalışmalarının bu konuyu açıklığa kavuşturmak için önemli veriler sağlayacağı kanısındayız. Yapılacak bu prevalans çalışmaları ve kan ürünlerinin hastalara verildikten sonraki takibinin, ileride kan bağışçılarında PV-B19 için rutin tarama testinin yapılmasına katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

Parvovirus infeksiyonlarının tanısı serumda B19 özgül IgG ve IgM antikorlarının veya viral DNA'nın saptanmasıyla konulmaktadır. Hematolojik maligniteli hastalarda prognozu etkileme potansiyeli göz önüne alındığında, tanı yanında bu hastalarda virolojik takibinin yapılması büyük önem arz etmektedir. Işık ve ark. (75) 15 yaş altı 126 çocuk ve 20 yaş üstü 44 erişkinde PV-B19 infeksiyonu tanısı amacıyla PV-B19 özgül IgG ve IgM antikorları oranlarının belirlenmesi ve PV-B19 özgül IgM antikorları pozitif bulunan hastaların Real-time PZR ile PV-B19 DNA'sının 10 hafta arayla ölçülmesini amaçlamıştır. Çalışmaya dahil edilen 15 yaş altı çocuklardan alınan serum örneklerinin 34'ünde (%26,9) IgG ve 12'sinde (%9,5) IgM'in pozitif olarak bulunduğu belirtilmiştir. 20 yaş üstü erişkin grubu serum örneklerinin 24'ünde (%54,5) IgG ve birinde (%2,2) IgM'in pozitif olarak bulunduğu belirtilmiştir.

Bu iki grup içinde IgM pozitif bulunan 13 hastanın B19 DNA miktarlarının Real-time PZR ile pozitif olarak bulunduğu belirtilmiştir. Daha sonra IgM pozitif bulunan bu 13 hastadan birer hafta aralıklarla alınan kan örneklerinde ELISA ile IgM antikoru ve Real-time PZR ile DNA miktarları, olgularda IgM antikoru negatif bulunana kadar araştırılmıştır. Sonuçta dört hastada 5. haftada, altı hastada 7. haftada ve üç hastada 9. haftada IgM antikoru negatif olarak bulunduğu belirtilmiştir. 10. haftada alınan kan örneklerinde hastaların tümünün IgM antikoru negatif olmasına rağmen Real-time PZR ile DNA miktarlarının düşük titrede pozitif olarak bulunduğu belirtilmiştir (75). Sonuçta B19 enfeksiyonu tanısıyla ilgili olarak, özgül IgM antikoru negatif bulunsan da PV-B19 özgül DNA miktarının pozitif bulunabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle antikor yanıtı yetersiz immün yetmezlikli hastalarda DNA miktarlarının Real-time PZR gibi nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ile test edilmesinin yararlı olabileceği düşünülmelidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada, Mersin bölgesinde yaşayan hematolojik maligniteli 100 hasta ve 104 kan bağışçısında PV-B19 varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. PV-B19 DNA pozitifliği hasta grubunda 20/100 (%20), kontrol grubunda ise 8/104 (%7,69) olarak bulunmuştur. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,017$).

Lösemili hasta grupları ($n=91$), akut (ALL ve AML) ve kronik (KLL ve KML) olarak ikiye ayrıldığında; akut lösemili grupta 4 (%4,4), kronik lösemili grupta ise 15 (%16,48) PV-B19 DNA pozitifliği saptandı. Bu pozitiflikler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kronik lösemili grup ve akut lösemili grup arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,0153$). Bu veriler bize kronik lösemili hastalarda persistent PV-B19 enfeksiyonunun varlığının bir göstergesi olabileceğini gösterdi.

Yaptığımız çalışmada elde edilen veriler sonucunda, immünsupresyon nedeniyle etkilenen immün cevap eksikliği gözlemlenen hematolojik hasta gruplarının, sağlıklı bireylere oranla PV-B19 enfeksiyonu açısından daha yüksek risk faktörü taşıdığı söylenebilir. Aynı zamanda diğer kronik lösemili hastalarda gözlemlenen yüksek pozitiflik bu enfeksiyonun persistentliğine işaret olabilir ve bu nedenle biz belirli aralıklarla PV-B19'un virolojik takibinin yapılması gerektiği kanısındayız.

Kan bağışçılarında elde edilen %7,69 PV-B19 pozitifliği, hematolojik hasta grupları için bir risk faktörüdür. Ancak yapılan çalışmalarda kan ürünleri kullanımı sonrasında akut enfeksiyon semptomlarının gözlenmesi açısından veriler yetersizdir. Bu nedenle kan ve kan ürünleri transfüzyonu alan hematolojik hastalarda PV-B19 açısından yapılacak virolojik takibin bu durumu aydınlatmak amacıyla büyük yararı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Brown KE.** The expanding range of parvoviruses which infect humans. *Rev Med Virol*, **2010**; 20(4):231-244.
2. **Allander T.** Human bocavirus. *Journal of Clinical Virology*, **2008**; 41(1):29-33.
3. **Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D.** Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, **1975**; 1(7898):72-73.
4. **Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P.** Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*, **1985**; 23(2):61-73.
5. **Jordan JA.** Human Parvoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. (Çeviri Ed: Başustaoğlu A) Ankara: Atlas Kitapçılık **2009**: 1622-1630.
6. **Yarkın F.** İnsan Parvoviruslar. In Ustaçelebi Ş . *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**: 913-919.
7. **Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A.** Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmün Rev*, **2008**; 8(2):116-120.
8. **Heegaard ED, Brown KE.** Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15(3):485-505.
9. **Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O.** Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern Med*, **2006**; 260(4):285-304.
10. **Koenigbauer F, Eastlund T, John W.** Clinical illness due to Parvovirus B19 infection after injection of solvent/ detergent treated pooled plasma. *Transfusion*, **2000**; 40:1203-1206.
11. **Lindblom A, Heyman M, Gustafsson I, Norbeck O, Kaldensjö T, Vernby A, Henter JI, Tolfvenstam T, Broliden K.** Parvovirus B19 infection in children with acute lymphoblastic leukemia is associated with cytopenia resulting in prolonged interruptions of chemotherapy. *Clin Infect Dis*, **2008**; 46(4):528-536.
12. **Henderson BE.** Establishment of an association between a virus and a human cancer. *J Natl Cancer Inst*, **1989**; 81(5):320-321.
13. **Okochi K, Mori R, Miyazaki M, Cohen BJ, Mortimer PP.** Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *Lancet*, **1984**; 1(8369):160-161.

14. **Summers J, Jones SE, Anderson MJ.** Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J Gen Virol*, **1983**; 64(Pt 11):2527-2532.
15. **Clewley JP.** Biochemical characterization of a human parvovirus. *J Gen Virol*, **1984**; 65(Pt 1):241-245.
16. **Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L.** Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet*, **1981**; 1(8221):664-665.
17. **Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS.** Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet*, **1983**; 1(8338):1378.
18. **Yetkin S, Elmas SA.** Parvovirus-B19 and hematologic disorders. *Turk J Hematol*, **2010**; 27(1):224-233.
19. Virus Taxonomy. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2009, Erişim: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>. Erişim tarihi: 07.12.2011.
20. **Agbandje M, Kajigaya S, McKenna R, Young NS, Rossmann MG.** The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology*, **1994**; 203(1):106-115.
21. **Chipman PR, Agbandje-McKenna M, Kajigaya S, Brown KE, Young NS, Baker TS, Rossmann MG.** Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**; 93(15):7502-7506.
22. **Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG.** The structure of parvovirus B19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**; 101(32):11628-11633.
23. **Schwarz TF, Serke S, Von Brunn A, Hottenträger B, Huhn D, Deinhardt F, Roggendorf M.** Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation. *Zentralbl Bakteriol*, **1992**; 277(2):219-223.
24. **Servant-Delmas A, Lefrère JJ, Morinet F, Pillet S.** Advances in human B19 erythrovirus biology. *J Virol*, **2010**; 84(19):9658-9665.
25. **Bonvicini F, Filippone C, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M, Gallinella G.** Functional analysis and quantitative determination of the expression profile of human parvovirus B19. *Virology*, **2008**; 381(2):168-177.
26. **Chisaka H, Morita E, Yaegashi N, Sugamura K.** Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Rev Med Virol*, **2003**; 13(6):347-359.

27. **Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE.** 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*, **2006**; 80(12):5941-5950.
28. **Gallinella G, Venturoli S, Manaresi E, Musiani M, Zerbini M.** B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *J Clin Virol*, **2003**; 28(1):1-13.
29. **Baylis SA, Shah N, Minor PD.** Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J Virol Methods*, **2004**; 121(1):7-16.
30. **Jawetz.** *Parvoviridae*. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA editörs. *Medical Microbiology*. 24th ed. (Çeviri ed: Yenen OŞ), Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, **2010**: 413-418.
31. **Kornberg A.** DNA Replication. *Biochim Biophys Acta Review*, **1988**; 951(2-3):235-239.
32. **Strauss JH, Strauss GE.** *Viruses and Human Disease*. 2th Ed. Canada, Academic Press, **2008**: 314-323.
33. **White DO, Fener FJ.** Parvoviridae. *Medikal Viroloji*. 2th Ed. (Çeviri: Doymaz MZ) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi **2000**: 285-323.
34. **Best SM, Bloom ME.** Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus and similarities to b19 infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **2005**; 52(7-8):331-334.
35. **O'Sullivan MG, Anderson DC, Fikes JD, Bain FT, Carlson CS, Green SW, Young NS, Brown KE.** Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J Clin Invest*, **1994**; 93(4):1571-1576.
36. **Potter CG, Potter AC, Hatton CS, Chapel HM, Anderson MJ, Pattison JR, Tyrrell DA, Higgins PG, Willman JS, Parry HF, Cotes PM.** Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *J Clin Invest*, **1987**; 79(5):1486-1492.
37. **Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DA.** Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis*, **1985**; 152(2):257-265.
38. **Ergaz Z, Ornoy A.** Parvovirus B19 in pregnancy. *Reproduc Toxicol*, **2006**; 21(4):421-435.
39. **Türk Dağı H, Özdemir M, Baykan M, Baysal B.** Investigation of parvovirus B19 seroprevalence in various age groups in Central Anatolia Region, Turkey. *Mikrobiyol Bul*, **2010**; 44(3):467-472.
40. **Kelly HA, Siebert D, Hammond R, Leydon J, Kiely P, Maskill W.** The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Vietaria, Australia, compared with other parts of the world. *Epidemiol Infect*, **2000**; 124(3):449-457.

41. World Health Organization. Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. 2004, *WHO Technical Report*, Erişim:http://www.who.int/bloodproducts/publications/WHO_TRS_924_A4.pdf Erişim tarihi: 08.12.2011.
42. **Lamont RF, Sobel JD, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Kim SK, Uldbjerg N, Romero R.** Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*, **2011**; 118(2):175-186.
43. **Zaki ME, Ashray RE.** Clinical and hematological study for Parvovirus b19 infection in children with acute leukemia. *Int J Lab Hematol*, **2010**; 32(2):159-166.
44. **Kaptan K, Beyan C, Cetin T, Ural AU, Ustün C, Avcu F, Nevruz O, Güney C, Kubar A.** Anemia following human parvovirus B19 infection in a patient with polycythemia vera. *Am J Hematol*, **2002**; 69(4):296-297.
45. **Bonvicini F, Manaresi E, Di Furio F, De Falco L, Gallinella G.** Parvovirus b19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression. *PLoS One*, **2012**; 7(3):306-316.
46. **Yalcin A, Serin MS, Emekdas G, Tiftik N, Aslan G, Eskandari G, Tezcan S.** Promoter methylation of P15(INK4B) gene is possibly associated with parvovirus B19 infection in adult acute leukemias. *Int J Lab Hematol*, **2009**; 31(4):407-419.
47. **Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K.** CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood*, **2010**; 115(22):4569-4579.
48. **de Jong EP, Walther FJ, Kroes AC, Oepkes D.** Parvovirus B19 infection in pregnancy: new insights and management. *Prenat Diagn*, **2011**; 31(5):419-425.
49. **Zerbini M, Gallinella G, Cricca M, Bonvicini F, Musiani M.** Diagnostic procedures in B19 infection. *Pathol Biol (Paris)*, **2002**; 50(5):332-338.
50. World Health Organization, Expert Committee On Biological Standardization. Geneva. 2009, *World Health Organization*, Erişim: http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_BS_09.2122_eng.pdf Erişim tarihi: 14.02.2012.
51. World Health Organization. WHO International Standard 2nd International Standard for Anti-Parvovirus B 19 plasma, human 2008, World Health Organization Erişim: <http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/01-602.pdf> Erişim tarihi: 17.02.2012.
52. **Polcz ME, Adamson LA, Datar RS, Fowler LJ, Hobbs JA.** Detection of parvovirus b19 capsid proteins in testicular tissues. *Urology*, **2012**; 79(3):744-749.

53. **Işık N, Ağaçfidan A.** İnsan Parvovirus B19 İnfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Moleküler Biyoloji Yöntemleri. *Turk Mikrobiyol Cem Derg*, **2003**; 33(1):377-380.
54. **Zerbini M, Gentilomi G, Cricca M, Manaresi E, Bonvicini F, Musiani M.** A system to enhance the sensitivity of digoxigenin-labelled probe: detection of B19 DNA in serum samples. *J Virol Methods*, **2001**; 93(1-2):137-144.
55. **Gentilomi G, Musiani M, Zerbini M, Gallinella G, Venturoli S, Manaresi E.** Dot immüno-peroxidase assay for detection of parvovirus B19 antigens in serum samples. *J Clin Microbiol*, **1997**; 35(6):1575-1578.
56. **Musiani M, Gallinella G, Venturoli S, Zerbini M.** Competitive PZR-ELISA protocols for the quantitative and the standardized detection of viral genomes. *Nat Protoc*, **2007**; 2(10):2511-2519.
57. **Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, Beutel K, Schmitt HJ, Ullmann U, Rautenberg P.** New LightCycler PZR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39(12):4413-4419.
58. **Çelik Ü, Kocabaş E.** Gebelikte parvovirus infeksiyonları ve fetomaternal etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **2008**; 51(1):110-116.
59. **Jordan SC, Toyoda M, Kahwaji J, Vo AA.** Clinical aspects of intravenous immüno-globulin use in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, **2011**; 11(2):196-202.
60. **Cosmi E, Mari G, Delle Chiaie L, Detti L, Akiyama M, Murphy J, Stefos T, Ferguson JE , Hunter D, Hsu CD, Abuhamad A, Bahado-Singh R.** Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, **2002**; 187(5):1290-1293.
61. **Franssila R, Hedman K.** T-helper cell-mediated interferon-gamma, interleukin-10 and proliferation responses to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *Vaccine*, **2004**; 22(27-28):3809-3815.
62. **Bassols AC.** Parvovirus B19 and the new century. *Clin Infect Dis*, **2008**; 46(4):537-539.
63. **Ballou WR, Reed JL, Noble W, Young NS, Koenig S.** Safety and immüno-genicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J Infect Dis*, **2003**; 187(4):675-678.
64. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 3*, 2th Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**: 213-300.

65. **Sifakis S, Ergazaki M, Sourvinos G, Koffa M, Koumantakis E, Spandidos DA.** Evaluation of Parvo B19, CMV and HPV viruses in human aborted material using the polymerase chain reaction technique. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **1998**; 76(2):169-173.
66. **Fryer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, Baylis SA.** Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals. *Transfusion*, **2007**; 47(6):1054-1061.
67. **Jitschin R, Peters O, Plentz A, Turowski P, Segerer H, Modrow S.** Impact of parvovirus B19 infection on paediatric patients with haematological and/or oncological disorders. *Clin Microbiol Infect*, **2011**; 17(9):1336-1342.
68. **El-Mahallawy HA, Mansour T, El-Din SE, Hafez M, Abd-el-Latif S.** Parvovirus B19 infection as a cause of anemia in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients during maintenance chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2004**; 26(7):403-406.
69. **Soliman Oel-S, Abd El-Aal Hegazi Hasan M, El-Ashry R, Zaghloul MH, Kora B.** Parvovirus B19 infection in pediatric oncology patients: diagnostic value of clinical and serologic parameters compared with nested PCR. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2009**; 31(3):173-176.
70. **Us T, Ozune L, Kasifoglu N, Akgun Y.** The investigation of parvovirus B19 infection in patients with haematological disorders by using PCR and ELISA techniques. *Braz J Infect*, **2007**; 11(3):327-330.
71. **Heegaard ED, Panum Jensen I, Christensen J.** Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J Med Virol*, **2001**; 65(2):362-367.
72. **Tsujimura M, Matsushita K, Shiraki H, Sato H, Okochi K, Maeda Y.** Human parvovirus B19 infection in blood donors. *Vox Sang*, **1995**; 69(3):206-212.
73. **Plentz A, Hahn J, Knöll A, Holler E, Jilg W, Modrow S.** Exposure of hematologic patients to parvovirus B19 as a contaminant of blood cell preparations and blood products. *Transfusion*, **2005**; 45(11):1811-1815.
74. **Satake M, Hoshi Y, Taira R, Momose SY, Hino S, Tadokoro K.** Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion*, **2011**; 51(9):1887-1895.
75. **Işık N, Sabahoğlu E, Işık DM, Anak S, Ağaçfidan A, Bozkaya E.** Klinik Olarak Parvovirus B19 İnfeksiyonu On Tanılı Olguların Virolojik Takibi. *Turk Mikrobiyol Cem Derg*, **2004**; 34(1):62-66.

ÖZGEÇMİŞ

15.04.1985 tarihinde Şanlıurfa'nın Halfeti ilçesinde doğdu. İlköğretim ve liseyi Gaziantep'te tamamladı. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.