

Piotr Grabarczyk, Jolanta Korzeniowska*, Grzegorz Liszewski, Aleksandra Kalińska,
Ewa Sulkowska, Maria Krug-Janiak**, Aneta Kopacz, Magdalena Łętowska***, Ewa Brojer****

BADANIE DNA PARVOWIRUSA B19 (B19V) U POLSKICH DAWCÓW KRWI, 2004-2010

PARVOVIRUS B19 DNA TESTING IN POLISH BLOOD DONORS, 2004-2010

Zakład Wirusologii

***Zakład Diagnostyki

****Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

*Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Lublinie

**Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu

STRESZCZENIE

Od 2004 roku u dawców krwi, których osocze wykorzystywane jest do produkcji immunoglobulin anti-D i anti-HBs oraz u dawców erytrocytów przeznaczonych do immunizacji dawców osocza, używanego do produkcji immunoglobuliny anti-D prowadzone są przeglądowe badania DNA Parwowirusa B19 (B19V).

Celem pracy jest przedstawienie dotychczas stosowanej metodyki badań, kontroli jakości oraz wyników w latach 2004-2010.

Material i metody. Badania były wykonywane w pojedynczych donacjach w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Lublinie lub w pulach osocza złożonych z 24 próbek w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Warszawie. Detekcję wirusa prowadzono ilościową metodą real-time PCR (początkowo metodą *home made*, później testem komercyjnym Artus Parvo B19 RG PCR Kit na aparacie Rotor Gene 6 000) poprzedzoną izolacją kwasów nukleinowych na złożach krzemionkowych (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN lub Prepito Viral DNA/RNA, Chemagen). Przebadano łącznie 17 625 donacji: 8 539 w pulach oraz 9 090 w pojedynczych donacjach. Oba laboratoria co roku uczestniczyły w zewnętrznych programach kontroli jakości (Proficiency Study VQC, Amsterdam, Holand; EQA Programme, Glasgow, Scotland). Dodatkowo dla RCKiK przygotowano panel kontroli jakości obejmujący próbki ujemne oraz dodatnie m.in. z bardzo wysokim stężeniem DNA B19V oraz zakażoną genotypem 2.

Wyniki W analizowanym okresie czasu zakażenie B19V identyfikowano w 1 na 980 donacji. Najczęściej identyfikowano niskowiremiczne zakażenia przewlekłe (1 na 1037 donacji), ostre zakażenie z wysoką wiremią stwierdzono u jednego dawcy (1 na 17 625 donacji).

ABSTRACT

Since 2004 Polish blood donors have been tested for parvovirus B19 (B19V) DNA. The screening testing has been performed in donors of plasma for fractionation and anti-D and anti-HBs production and donors of erythrocytes used for immunization. **Aim** is to present methods of the testing, quality control and results in period 2004-2010.

Material and Methods. Testing was performed in individual donation testing (IDT) in Regional Blood Transfusion Center (RBTC) in Lublin or in pools of 24 in Institute of Haematology and Transfusion Medicine in Warsaw (IHTM). Quantitative testing with real-time PCR was preceded with nucleic acid isolation on silica based methods (Prepito Viral DNA/RNA, Chemagen and QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN). Amplification was performed initially with home made method and later with commercial assay (Artus Parvo B19 RG PCR Kit on Rotor Gene 6 000). In total 17 625 donations were tested: 8 539 in pools and 9 090 individually. Beside routine external quality control programmes in which both laboratories participated (Proficiency Study VQC, Amsterdam, Holland; EQA Programme, Glasgow, Scotland), panel containing negative samples, positive with very high DNA B19V level and plasma infected with genotype 2 was prepared for RBTC in Lublin.

Results B19V infection frequency was 1: 980 donations, low viraemic donations were detected most frequently (1:1 037). It was identified only one donation with DNA load that could cause potential health risk for plasma product recipients (1:17 625). In one of the donors B19V DNA was observed for 3 years and 3 months. In acute or persistent phase of infection no clinical or laboratory symptoms (morphology of peripheral blood, ALT) were observed.

Badania kolejnych próbek jednego z zakażonych dawców oraz jego wcześniejszych próbek wykazały zakażenie trwające ponad 3 lata 3 miesiące. Zarówno ostremu, jak i przewlekłym zakażeniom w badaniu lekarskim oraz w badaniu morfologii krwi obwodowej nie towarzyszyły żadne objawy kliniczne. Ze względu na ryzyko zaniżania wyników badań ilościowych związane z polimorfizmem wirusa wszystkie donacje zakażone B19V nie były dopuszczane do użytku klinicznego.

Słowa kluczowe: badania przeglądowe, dawcy krwi, parvovirus B19, DNA B19V

Due to risk of underestimation of viral load connected with viral genome polymorphism all donations with B19V positive result were not allowed to be clinically used.

Key words: screening, blood donors, parvovirus B19, DNA B19V

WSTĘP

Zakażenie Parvowirusem B19 (B19V - rodzina *Parvoviridae*, rodzaj *Parvovirus*) występuje powszechnie. Receptorem dla B19V jest antygen P (globozyd) obecny na prekursorach erytrocytów, megakariocytach, komórkach śródbłonna oraz miocytach płodowych. Zakażenie B19V u osób zdrowych przebiega bezobjawowo lub towarzyszą mu w pierwszej fazie objawy grypopodobne (np. gorączka, dreszcze, ból głowy), w okresie późniejszym, po rozpoczęciu produkcji przeciwciał klasy IgM, może wystąpić, głównie u dzieci, wysypka (tzw. „rumień zakaźny”), niektóre osoby dorosłe odczuwają w tym okresie bóle reumatyczne. W pierwszych dniach po zakażeniu, gdy nie ma jeszcze przeciwciał poziom wirerii gwałtownie rośnie nawet do 10^{12} geq/ml (genome equivalents/ml). Między 7 a 14 dniem, kiedy pojawiają się przeciwciała neutralizujące klasy IgM poziom wirerii spada. Immunoglobuliny tej klasy są wykrywane przez okres do 6 miesięcy. Specyficzne przeciwciała klasy IgG pojawiają się w trzecim tygodniu zakażenia i wykrywane są przez resztę życia (1, 2).

Zakażenie B19V może mieć ciężki przebieg u osób z osłabioną odpornością: np. u chorych przyjmujących leki immunosupresyjne czy chemioterapię, u zakażonych wirusem HIV, powodując przewlekłą anemię. U chorych ze wzmożoną erytropoezą wywołuje przejściowy przełom aplastyczny (1); natomiast u części kobiet w ciąży, które uległy zakażeniu B19V (szczególnie I i II trymestr) może dojść do nieimmunologicznego obrzęku płodu, wrodzonej anemii u dziecka lub innych powikłań łącznie z poronieniem (3).

Przeniesienie zakażenia następuje przede wszystkim drogą kropelkową przez drogi oddechowe, ale także w okresie płodowym z matki na dziecko oraz przez przeszczepiane narządy i tkanki (1, 3) m.in. szpik kostny (4), nerkę (5). Opisano wiele przypadków przeniesienia zakażenia B19V przez przetoczenie krwi i jej składników (2). Biorcy krwi, otrzymujący częste toczenia należą do grupy zwiększonego ryzyka zakażenia B19V - u nich częstość przeciwciał anti-B19V jest większa niż w populacji generalnej (6).

Farmakopeja Europejska zaleca, aby DNA B19V badać metodą ilościową u wszystkich dawców osocza przeznaczonego do produkcji immunoglobulin anti-RhD. Do produkcji nie dopuszcza się osocza zawierającego ilość B19V, która może spowodować przekroczenie dopuszczalnego progu 10^4 IU/ml w puli produkcyjnej (2). W Polsce badania takie są prowadzone od 2004 roku. Dodatkowo są nimi objęci dawcy krwinek czerwonych przeznaczonych do immunizacji dawców osocza wykorzystywanego do produkcji immunoglobuliny anti-D oraz dawcy osocza do produkcji immunoglobuliny anti-HBs (7).

Celem pracy było przedstawienie po raz pierwszy wyników badań przeglądowych DNA B19V u polskich dawców krwi, stosowanej metodyki badań oraz procedur kontroli jakości w latach 2004-2010.

MATERIAŁ I METODY

Wykrywanie DNA B19V prowadzono metodą real-time PCR stosując różne strategie, testy oraz sposoby izolacji kwasów nukleinowych. Badania w latach 2004-2008 (okres I) prowadzono w Pracowni Biologii Molekularnej IHiT, a od 2008 r. do 2010 r. w Pracowni Biologii Molekularnej Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Lublinie (RCKiK Lublin, okres II).

W I okresie przebadano 5 971 donacji przeznaczonych do frakcjonowania. Badania wykonywano w pulach osocza otrzymanych poprzez zlanie 24 donacji. Pulowanie odbywało się przy pomocy automatycznej stacji pipetującej TECAN RSP 200 (TECAN AG, Hombrechtikon, Switzerland) pracującej pod nadzorem oprogramowania PMS i Logic (Hamburg, Germany). W przypadku wykrycia DNA B19V w puli, badano każdą z 6 minipul otrzymanych przez zlanie 4 donacji, a następnie pojedyncze donacje wchodzące w skład dodatniej minipuli. Poza donacjami przeznaczonymi do frakcjonowania, stosując tą samą strategię, przebadano 2 568 donacji pochodzących od losowo wybranych dawców.

DNA izolowano z 200 μ l osocza metodą manualną QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH,

Tabela I. Wykrywanie DNA B19V u dawców krwi w Polsce w latach 2004–2010

Table I. B19V DNA detection in blood donors in Poland, in period 2004–2010

| Typ donacji | Liczba przebadanych donacji | Liczba Odsetek | | Poziom DNA B19V (IU/ml) w próbkach dodatnich |
|---|-----------------------------|-------------------|-------|--|
| | | donacji dodatnich | | |
| Okres I - badania w pulach po 24 donacje w IHiT | | | | |
| Do frakcjonowania | 5 971 | 3* | 0,05% | <10 ⁴ szczegóły rycinia 1 |
| Losowo wybrane | 2 568 | 3 | 0,12% | <10 ⁴ |
| Łącznie w IHiT ¹ | 8 539 | 6 | 0,07% | |
| Okres II - badania pojedynczych donacji w RCKiK Lublin ² | | | | |
| Do frakcjonowania | 9 090 | 12** | 0,13% | Dawca I: 21.01.2010 – 201 242 IU/ml, IgG(-), IgM(-) 04.02.2010 - 3 850 IU/ml, IgG(+)62 IU/ml, IgM(+)3,8 IU/ml 18.02.2010 – 95 IU/ml, IgG(+)178 IU/ml, IgM(-) |
| | | | | Dawca II: 01.04.2010 - 220 IU/ml, donacja po 15 dniach - 14 IU/ml, po 29 dniach - 5 IU/ml, po 43 - nie wykryto DNA B19V, 57 - 81 IU/ml, 77 - 49 IU/ml, 86 - 269 IU/ml, 99 - 70 IU/ml, 113 - 34 IU/ml, 127 - 96 IU/ml, po 194 dniach - 161 IU/ml. |
| Łącznie w IHiT oraz w RCKiK Lublin | 17 625 | 18 | 0,10% | |

* donacje pochodziły od jednego dawcy, ** 3 donacje pochodziły od jednego a 9 od kolejnego dawcy

¹ Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

² Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Lublinie

Hilden, Niemcy) lub przy pomocy zautomatyzowanej procedury na aparacie Nuclisens Extractor (odczynniki Nuclisens automated isolation reagents, BioMerieux, Boxtel, Holandia) z 2 ml osocza. Genom wirusa wykrywano metodą real-time PCR typu *home-made* (8). 100% próg detekcji wirusa wynosił 125 IU/ml i 50 IU/ml dla real-time PCR poprzedzonej odpowiednio izolacją QIAamp i Nuclisens. Korelacja wartości Ct i stężenia DNA B19V w przypadku obu metod wynosiła około 0,99. Od roku 2007 DNA B19V wykrywano metodą RealArt Parvo B19 TM PCR Kit (Artus GmbH, Hamburg, Niemcy) na aparacie ABI Prism 7700 (Applied Biosystem, Singapur).

W okresie II, w RCKiK Lublin przebadano 9 090 donacji (badania w pojedynczej donacji; IDT, ang. *individual donation testing*) testem Artus Parvo B19 RG PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hamburg, Niemcy) na termocyklerze Rotor-Gene 6 000 (Corbette, Australia). Amplifikacja kwasów nukleinowych poprzedzona była manualną izolacją kwasów nukleinowych QIAamp DNA Mini Kit (od maja do listopada 2007, QIAGEN GmbH, Hamburg, Niemcy) lub automatyczną Chemagen (od grudnia 2007; Prepito Viral DNA/RNA 200 Kit na aparacie PREPITO firmy Chemagen).

W obu laboratoriach stosowano procedury ograniczające ryzyko wystąpienia wyników fałszywie dodatnich (9).

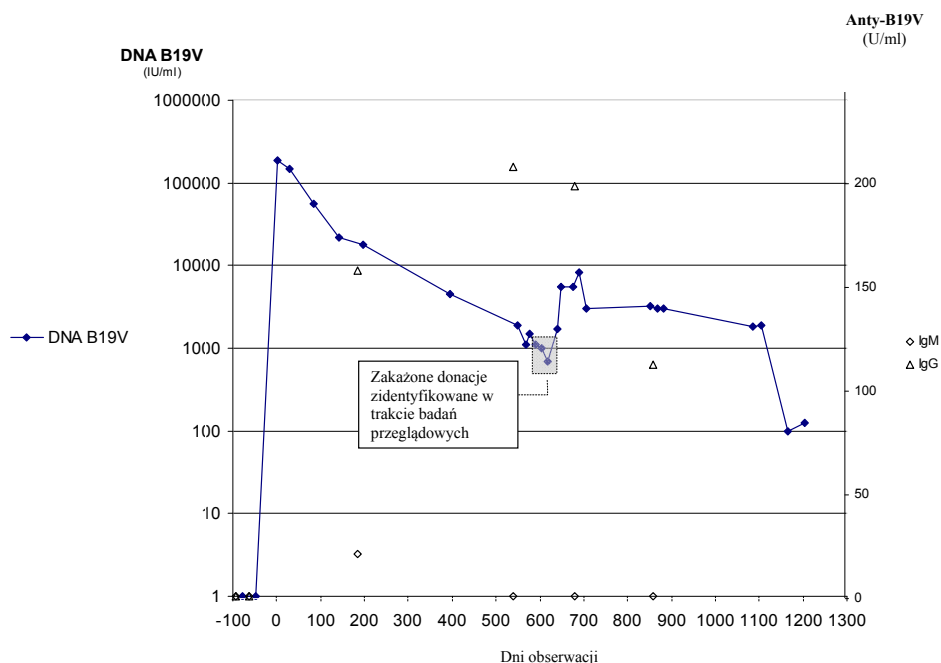
Badania DNA B19V co roku były poddawane zewnętrznej kontroli jakości - początkowo w ramach programu Parvo B19 - DNA Proficiency Study VQC (Amsterdam, Holandia), a od roku 2007 w trakcie programu Quality Control for Molecular Diagnostics (Parvovirus B19 DNA EQA Programme, Glasgow, Szkocja). Dodatkowo laboratorium w Lublinie przebadano panel

kontroli jakości, w skład którego wchodziły 3 próbki ujemne oraz 3 zakażone B19V. Próbkę dodatnie przygotowano przez: rozcieńczenie standardu WHO (NIBSC 99/800), z próbki zakażonej genotypem 2 (10) oraz w której stwierdzono skrajnie wysoką wiramię (11).

Badania ilościowe swoistych przeciwciał anti-B19V były wykonywane testem recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM (Microgen, GmbH Neuried, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta.

WYNIKI

W latach 2004-2010 DNA B19V wykryto w osiemnastu na ponad siedemnaście tysięcy sześćset przebadanych donacji (1:980). W siedemnastu donacjach poziom DNAemii był <10⁴ IU/ml (1:1 037), w jednej wynosił >10⁴ IU/ml (1:17 625) (tab. I). Należy podkreślić, że większość dawców, którzy oddają krew do frakcjonowania to dawcy wielokrotni, regularnie oddający krew. Donacje zakażone B19V pochodziły od trzech dawców. W jednym przypadku zakażenie zidentyfikowano w 3 donacjach pochodzących od 38-letniego dawcy osocza do produkcji anti-HBs. W związku z tym, że dawca regularnie oddawał krew przez wiele lat zanim wprowadzono badanie DNA B19V do krwiodawstwa, możliwe było retrospektywne przebadanie próbek archiwalnych. Dodatkowo przez wiele miesięcy śledzono prospektywnie przebieg DNAemii w oczekiwaniu na całkowite ograniczenie infekcji i przywrócenie dawcy do oddawania krwi. Łącznie DNA B19V wykrywano u tego dawcy przez okres ponad 3 lat i 3 miesiące (ryc. 1). Badania próbek archiwalnych pozwoliły wykryć początek zakażenia z wiramię 10⁶ IU B19 DNA/ml. W okresie póź-



Rycina 1. Przewlekłe zakażenie B19V u dawcy krwi
Figure 1. Persistent B19V infection in blood donor

niejszym poziom wirusa spadł do 10^3 IU B19 DNA/ml i utrzymywał się na tym poziomie przez wiele miesięcy. W ostatniej dostępnej próbce nadal wykrywano DNA wirusa (ok. 100 IU/ml), a zatem nie można wykluczyć, że zakażenie było wykrywalne w osoczu w okresie późniejszym. Dodatkowo przeprowadzono badanie swoistych przeciwciał. W początkowej fazie zakażenia obserwowano typową serokonwersję - pojawienie się przeciwciał klasy IgM, później także IgG, a następnie zanik IgM. Przez 7 miesięcy po serokonwersji, stężenie przeciwciał w klasie IgG utrzymywało się na wysokim poziomie (około 200 IU/ml). W trakcie zakażenia, w badaniu lekarskim nie obserwowano żadnych objawów klinicznych. Również w badaniach laboratoryjnych, parametry takie, jak stężenie hemoglobiny, hematokryt, liczba płytek, krwinek czerwonych, krwinek białych oraz poziom aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) pozostawały w normie.

W drugim przypadku, w którym wykryto DNA B19V jednocześnie w trzech donacjach od jednego dawcy, przebieg zakażenia był inny. Tym razem zostało ono stwierdzone u dawcy we wczesnym okresie infekcji, o czym świadczy wysokie stężenie DNA B19V w osoczu (2×10^5 IU/ml) przy jednoczesnym braku markerów serologicznych. W kolejnej donacji pobranej po 14 dniach obecne były już zarówno przeciwciała klasy IgG jak i IgM, zaś stężenie DNA B19V uległo redukcji o blisko dwa rzędy wielkości (100-krotnie). Po kolejnych dwóch tygodniach wykryto bardzo niskie stężenie B19V DNA (niepełna 100 IU/ml) przy jednocześnie wysokim stężeniu swoistych przeciwciał klasy IgG i braku przeciwciał klasy IgM.

U kolejnego zakażonego dawcy, u którego w badaniach przeglądowych stwierdzono DNA B19V w aż 9 donacjach, stężenie materiału genetycznego wirusa w okresie ponad pół roku (194 dni) wahało się od 5 IU/ml do 269 IU/ml, a w jednej z próbek było nawet niewykrywalne. Wielomiesięczne utrzymywanie się tak niskiego stężenia DNA B19V w osoczu wskazuje na przewlekłą fazę zakażenia.

Donacje reaktywne były zatrzymywane i nie przekazywano ich ani do frakcjonowania, ani do użytku klinicznego, dawca był czasowo zawieszany, aż do momentu zaniku DNA B19V w osoczu.

Oba laboratoria uczestniczyły w programach kontroli jakości, które potwierdziły, że w trakcie procedury nie dochodzi do kontaminacji oraz generowania wyników fałszywie dodatnich, a próbki dodatnie są prawidłowo zidentyfikowane. W dodatkowo wykonanym panelu kontroli jakości laboratorium w Lublinie prawidłowo zidentyfikowało próbki dodatnie, w tym ze skrajnie

Tabela II. Kontrola jakości ilościowego badania DNA B19V metodą real-time PCR

Table II. Quality control of quantitative real-time PCR detection of B19V DNA

| Nr próbki | DNA B19V | | Genotyp | Wyniki badania próbek kontrolnych | |
|-----------|----------|--------------|---------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Wynik | Stężenie | | Wynik | Stężenie |
| 1 | Ujemny | 0 IU/ml | - | Ujemna | 0 IU/ml |
| 2 | Dodatni | 10^5 IU/ml | 1 | Dodatnia | $3,3 \times 10^4$ IU/ml |
| 3 | Ujemny | 0 IU/ml | - | Ujemna | 0 IU/ml |
| 4 | Dodatni | 10^4 IU/ml | 2 | Dodatnia | $6,51 \times 10^1$ IU/ml |
| 5 | Ujemny | 0 IU/ml | - | Ujemna | 0 IU/ml |
| 6 | Dodatni | 10^9 IU/ml | 1 | Dodatnia | $1,8 \times 10^{10}$ IU/ml |

wysoką wiramię oraz zakażoną genotypem 2. W ostatnim przypadku stwierdzono jednak zniżenie wyniku badania ilościowego o dwa rzędy wielkości (tab. II).

DYSKUSJA

Badania prowadzone u dawców krwi, oprócz spełniania swojego podstawowego zadania jakim jest zapobieganie przeniesienia zakażenia, są istotnym źródłem danych epidemiologicznych. Dotychczas publikowano dane dotyczące częstości wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko B19V u kobiet w ciąży w Polsce (12, 13); wykrywania DNA B19V i markerów serologicznych zakażenia u chorych – u kobiet w ciąży z nieimmunologicznym obrzękiem płodu (14, 15) oraz u chorych na hemofilię (6). W obecnej pracy przedstawiono po raz pierwszy wyniki badań przeglądowych DNA B19V u polskich dawców krwi. Częstość wykrywania DNA B19V w niniejszej analizie jest porównywalna z obserwowaną w innych krajach, gdzie prowadzone są tego typu badania (16, 17). W Niemczech i w Austrii, w latach 2000 - 2004 obserwowano podobną częstość jak w Polsce, jednak przez 2 kolejne lata (maj 2004 – 2006) ona była kilkukrotnie wyższa, co interpretowano jako okres epidemicznego występowania zakażenia B19V (18). Pewnym ograniczeniem analizowanej grupy badanej jako źródła danych epidemiologicznych jest fakt, że większość donacji do produkcji anty-D oraz anty-HBs pochodzi od dawców wielokrotnych. W I okresie badań dodatkowo analizowano grupę losowo wybranych donacji, wśród których większy udział miały donacje od dawców pierwszorazowych i te wyniki mogą bardziej odzwierciedlać częstość zakażeń w populacji ogólnej w Polsce.

Dzięki identyfikacji zakażenia B19V u trzech dawców wielokrotnych możliwe było prześledzenie przebiegu zakażenia przez dłuższy okres czasu. U jednego z dawców, u którego zidentyfikowano zakażenie w II okresie badań, w ciągu miesiąca wiramia uległa istotnemu ograniczeniu ($z > 10^5$ do $< 10^2$ IU DNA B19V/ml). W tym przypadku jednak zgromadzone dane nie pozwalają na stwierdzenie, czy doszło do całkowitej eliminacji zakażenia. Obserwacja kolejnego dawcy zakażonego w okresie badań prowadzonych w Lublinie pokazuje, że nawet po zaniku DNA wirusa w osoczu może się ono ponownie pojawić w ilości wykrywalnej stosowanymi metodami diagnostycznymi. Dłuższym okresem obserwacji dysponujemy w przypadku dawcy z I części badań, gdzie udokumentowano przewlekłe zakażenie trwające przez przynajmniej 3 lata i 3 miesiące. Tak długotrwałe infekcje wykrywalne we krwi obwodowej były opisywane zarówno u chorych, zwłaszcza z osłabioną odpornością (4, 5, 10), jak i u niektórych dawców (19, 20). Obecnie wiadomo, że w wielu przypadkach, wirus mimo eliminacji z krwi obwodowej,

może przetrwać w szpiku kostnym, w błonie maziowej, skórze i innych tkankach. Dyskutowane jest wiele mechanizmów tego typu zjawiska, nie jest ono jednak w pełni wyjaśnione (2). Musimy pamiętać, że wykrywanie bardzo niskiego, nieistotnego klinicznie, stężenia DNA B19V, nawet wiele lat od chwili zakażenia, ma bardzo istotne konsekwencje dla interpretacji wyników badań diagnostycznych. Zjawisko to utrudnia różnicowanie ostrego zakażenia o potencjalnym znaczeniu klinicznym i przewlekłego, które może być wynikiem zakażenia, do którego doszło nawet kilka lat wcześniej. W tym drugim przypadku zakażeniu przeważnie nie towarzyszą żadne objawy kliniczne. Dlatego w diagnostyce B19V niezbędne jest korzystanie zarówno z metod serologicznych, jak również z ilościowych metod molekularnych. Łączna analiza wyników tych badań pozwala na trafne określenie, czy mamy do czynienia z zakażeniem istotnym klinicznie.

Kolejną przyczyną trudności w diagnostyce B19V na poziomie molekularnym jest skrajnie wysoka wiramia sięgająca nawet 10^{12} geq/ml (1), zwłaszcza w początkowej fazie zakażenia, gdy jeszcze nie są produkowane przeciwciała neutralizujące. Należy podkreślić, że niedawno poznane genotypy 2 i 3 mogą nie być wykrywane lub ich ilość może być zaniżana, zarówno w badaniach prowadzonych testami komercyjnymi, jak i typu *home made* (21-23). Wobec ryzyka występowania wyników fałszywie ujemnych powodowanych wysoką wiramię oraz zakażeniem formą polimorficzną, istotnym zagadnieniem w molekularnych badaniach diagnostycznych jest właściwa kontrola jakości (21-23). Ostatnio w Polsce zidentyfikowano aktywne zakażenia genotypem 2, u chorych z osłabioną odpornością (10). Tą formę polimorficzną wykrywano także w osoczu przeznaczonym do frakcjonowania pochodzącym od dawców z Europy Środkowej (24). Ze względu na wspomniane obserwacje epidemiologiczne, w panelu kontroli jakości umieszczono próbkę zakażoną genotypem 2.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

U dawców krwi, których osocze jest używane do produkcji immunoglobulin anty-D i anty-HBs oraz u dawców erytrocytów przeznaczonych do immunizacji dawców osocza do produkcji immunoglobuliny anty-D prowadzone są od 2004 roku przeglądowe badania DNA Parwowirusa B19 (B19V). W pracy przedstawiono metodykę badań, kontrolę jakości oraz wyniki w latach 2004-2010.

Zakażenie B19V zidentyfikowano z częstością 1:980 donacji. Najczęściej wykrywano niskowiremiczne zakażenia przewlekłe (1:1 037 donacji), u jednego dawcy stwierdzono ostre zakażenie z wysoką wiramię (1:17 625 donacji). U jednego z dawców obserwowano

przewlekłe zakażenie B19V bez żadnych objawów klinicznych i laboratoryjnych przez ponad trzy lata i trzy miesiące. Zaniżenie wyniku ilościowego o dwa rzędy wielkości metodą stosowaną w II okresie badań B19V wskazuje na słuszność przyjętej strategii badań B19V w pojedynczej donacji i odsuwania od oddawania krwi dawców, u których stwierdzono B19V.

PIŚMIENNICTWO

- Young NS, Brown KE. Mechanisms of disease. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004; 350(6): 586-596.
- Parsyan A, Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion - an update. *Transfus Med.* 2007; 17(4): 263-278.
- de Jong EP, de Haan TR, Kroes ACM, Beersma MFC, Oepkes D, Walther FJ. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2006; 36: 1-7.
- Wąsak-Szulowska E, Grabarczyk P, Rzepecki P. Pure red cell aplasia due to parvovirus B19 infection transmitted probably through hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2008, 10: 201-205.
- Yango A Jr, Morrissey P, Gohh R, Wahbeh A. Donor-transmitted parvovirus infection in a kidney transplant recipient presenting as pancytopenia and allograft dysfunction. *Transpl Infect Dis* 2002, 4:163-166.
- Brojer E, Grabarczyk P, Łopaciuk S, Moraczewska Z, Żupańska B. Prevalence of human parvovirus B19 DNA and IgG/IgM antibodies in Polish haemophilia patients. *Vox Sang* 1999, 77: 107.
- Łętowska M. [red.] Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi, IHiT, Warszawa 2006 (wersja 4, 2010).
- Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods* 2001; 92: 183-191.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989, 339: 237-238.
- Grabarczyk P, Kalińska A, Kara M, Wiczorek R, Hejduk A, Sulkowska E, Michalak M, Gołębiowska-Staroszczyk S, Baylis SA, Brojer E. Identification and characterization of Parvovirus B19 genotype 2 acute infection in immunocompromised patients in Poland. *J Med Virol* 2011, 83 (1): 142-149.
- Grabarczyk P, Kalińska A, Sulkowska E, Brojer E. False negative results in high viremia Parvovirus B19-samples tested with real-time PCR. *Polish J Microbiol* 2010, 59, 2: 129-132.
- Siennicka J, Stefanoff P, Trzcińska A, Rosińska M, Litwińska B Seroprevalence study of parvovirus B19 in Poland. *Przegl Epidemiol* 2006; 60(3): 571-580.
- Mossong J, Hens N, Friederichs V i wsp. Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 1059-1068.
- Oszukowski P, Małafiej E, Pertyński T i wsp. Infection with parvovirus B19 in pregnant women. *Ginekol Pol* 1996; 67(3): 114-116.
- Lenkiewicz B, Roszkowski T, Grabarczyk P i wsp. Diagnosis of human parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis. *Ginekol. Pol.* 1998; 69(4): 175-181.
- Gessoni G, Barin P, Marchiori G. Nucleic acid amplification technique (NAT) screening for parvovirus B19: the first Italia routine experience. *Transf Med* 2007, 17, 417-419.
- Kleinman SH, Glynn SA, Lee T-H, Cobler L, Montalvo L, Todd D, Kiss JE, Shyamala V, Busch MP. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA level in blood donors with sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion* 2007, 47: 1756-1764.
- Schmidt M, Themann A, Drexler C, Bayer M, Lanzer G, Menichetti E, Lechner S, Wessin D, Prokoph B, Allain JP, Seifried E, Hourfar MK. Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion* 2007; 47 (10): 1775-1782.
- Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J-P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virology* 2004; 78(22): 12169-12178.
- Lefrere JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrere F, Girot R, Allain JP, Laperche S. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: Implications for transfusion safety. *Blood* 2005, 15: 2890-2895.
- Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JR, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: Identification of three genotypes. *J Virol* 2002, 76: 9124-9134.
- Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang* 2009; 97(1): 13-20.
- Baylis SA, Fryer JF, Grabarczyk P. Effect of probe binding mutations in an assay design to detect parvovirus B19: Implications for the quantitation of different virus genotype. *J Virol Methods* 2007; 139: 97-99.
- Schneider B, Becker M, Brackmann H-H, Eis-Hübinger AM. Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2. *Thromb Haemost* 2004; 92: 838-845.

Otrzymano: 29.09.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 15.11.2011 r.

Adres do korespondencji:

Dr Piotr Grabarczyk,
Zakład Wirusologii
Instytut Hematologii i Transfuzjologii,
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa,
e-mail: pgrabarczyk@ihit.waw.pl
tel. 22 349 66 00 wewn. 144