

Diagnostyka laboratoryjna zakażenia parvowirusem B19 u kobiet w ciąży



Rekomendacje polskiej grupy ekspertów, 2014:
Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych¹,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny²,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii³,
Polskie Towarzystwo Medycyny Perinatalnej⁴,
Polskie Towarzystwo Wirusologiczne⁵

^{1, 3, 5} dr hab. n. med. Piotr Grabarczyk, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Polskie Towarzystwo Wirusologiczne, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

^{1, 3} mgr Aleksandra Kalińska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

^{1, 2, 5} dr hab. n. med. Bogumiła Litwińska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, Polskie Towarzystwo Wirusologiczne

⁴ prof. dr hab. n. med. Zbigniew Celewicz, Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, konsultant wojewódzki w dziedzinie położnictwa i ginekologii dla województwa zachodniopomorskiego, Polskie Towarzystwo Medycyny Perinatalnej

⁴ dr n. med. Marzena Dębska, II Klinika Położnictwa i Ginekologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Pracownia Diagnostyki Prenatalnej Szpitala Bielańskiego w Warszawie,

⁴ dr hab. n. med. Dorota Nowakowska, Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz III Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polskie Towarzystwo Medycyny Perinatalnej (Przewodnicząca Oddziału Łódzkiego PTMP, Przewodnicząca Sekcji Zakażeń i Terapii Płodu Oddziału Łódzkiego PTMP)

^{1, 5} dr Elżbieta Puacz, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Polskie Towarzystwo Wirusologiczne

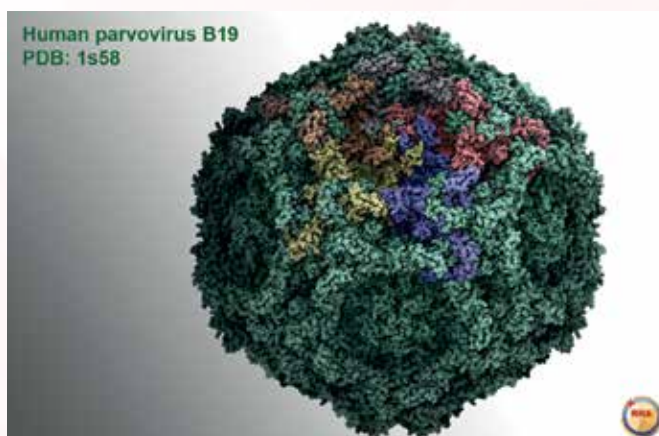
Warszawa 2014

Parwovirus B19 (B19V)

U osób z prawidłową odpornością zakażenie B19V zazwyczaj przebiega bezobjawowo. U dzieci może wystąpić rumień zakaźny („choroba piąta”, objawy infekcji wirusowej przebiegające z typową wysypką), a u dorosłych powiększenie węzłów chłonnych, złe samopoczucie, bóle stawowe, gorączka oraz w rzadkich przypadkach objawy zapalenia mięśnia sercowego.

Kobiety, które wcześniej nie przeszły infekcji i nie posiadają przeciwciał anty-B19V są narażone na zakażenie parwowirusem B19 w okresie ciąży. Niesie to ze sobą ryzyko wystąpienia poronienia czy nieimmunologicznego obrzęku płodu (zwłaszcza w I i II trymestrze ciąży) oraz niedokrwistości płodu czy noworodka. Przeniesienie zakażenia B19V od matki do płodu może być również przyczyną zapalenia mięśnia sercowego, zapalenia wątroby oraz zaburzeń neurologicznych. W większości przypadków rokowanie długoterminowe u dzieci, które przeżyją wewnątrzmaciczną infekcję B19V jest dobre.

Szczególną grupę chorych, u których mogą wystąpić istotne problemy kliniczne w przebiegu zakażenia parwowirusem B19 stanowią osoby z niedoborem odporności (np. zakażone wirusem HIV, chorzy otrzymujący chemioterapię, leki immunosupresyjne). U tych pacjentów w wyniku reaktywacji B19V bądź infekcji *de novo* może dojść do np. przewlekłej niedokrwistości. Pacjenci z pobudzeniem układu czerwono krwinkowego w szpiku są narażeni na wystąpienie przejściowego przełomu aplastycznego.



EPIDEMIOLOGIA

Zakażenie parwowirusem B19 jest powszechne na całym świecie, dotyczy głównie dzieci oraz młodzieży. Odsetek osób z przeciwciałami klasy IgG wzrasta wraz z wiekiem i w populacji dorosłych może przekroczyć nawet 90%. Infekcja B19V ma charakter sezonowy.

Na podstawie dotychczasowych obserwacji uważa się, że nawet u 50% zakażonych kobiet ciężarnych następuje transmisja wirusa od matki do płodu, a u blisko 10% z nich obserwuje się poważne powikłania, np. poronienie, nieimmunologiczny obrzęk płodu czy niedokrwistość. Trudna jest do oszacowania liczba powikłań mających wpływ na zdrowie i rozwój dzieci urodzonych z zakażeniem B19V. Szacuje się, iż około 40% kobiet w wieku rozrodczym w Polsce jest narażona na zakażenie B19V, a u 1-2% dochodzi do infekcji.

UWAGA: Przyjmując, że w Polsce co roku rejestrowanych jest 400 tysięcy kobiet w ciąży należy szacunkowo uznać, że u 6000 z nich dochodzi do zakażenia parwowirusem B19, a u 3000 ma miejsce transmisja wirusa do płodu i wówczas u około 300 płodów należy spodziewać się istotnych powikłań klinicznych. Uważa się, że w Polsce jest to problem niedodiagnozowany.

1. Diagnostyka laboratoryjna zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży

Diagnostyka laboratoryjna zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży jest podejmowana w trzech sytuacjach:

- a) **podejrzanie infekcji B19V w przypadku ekspozycji na zakażenie (kontakt kobiety w ciąży lub przed poczęciem z osobą, u której zdiagnozowano zakażenie),**
- b) **podejrzanie objawowego zakażenia B19V w ciąży w sytuacji stwierdzenia objawów klinicznych u ciężarnej lub płodu,**
- c) **poronienie o nieznanym przyczynie.**

Nieswoiste objawy kliniczne występujące w trakcie infekcji B19V mogą towarzyszyć również innym zakażeniom wirusowym (np. różyczce, grypie). Dlatego też w sytuacji uzasadnionej klinicznie należy wykonać badania diagnostyczne pozwalające na zróżnicowanie zakażenia B19V i innych infekcji wirusowych.

Potwierdzenie aktywnego zakażenia B19V pozwala podjąć odpowiednie działania polegające na odizolowaniu osoby zainfekowanej B19V od kobiet w ciąży i chorych z innych grup zwiększonego ryzyka wystąpienia istotnych powikłań będących następstwem zakażenia. Może mieć to szczególne znaczenie dla czasowej organizacji oddziałów szpitalnych oraz przychodni w przypadku stwierdzenia zakażenia.

Badania serologiczne pozwalają określić ryzyko zakażenia u kobiety w ciąży, która z racji wykonywanego zawodu (np. nauczyciel, pracownik służby zdrowia) czy sytuacji rodzinnej (małe dzieci w gospodarstwie domowym) może być szczególnie narażona na infekcję B19V.

Swoista diagnostyka laboratoryjna zakażenia parwowirusem B19 oparta jest na metodach immunoenzymatycznych oraz biologii molekularnej. W pierwszym przypadku wykrywane są przeciwciała anty-B19V, natomiast w drugim DNA wirusa. Badaniem pomocniczym w diagnozowaniu zakażenia B19V jest ocena cytologiczna szpiku.

1.1. Badania diagnostyczne metodami serologicznymi

Metody serologiczne wykorzystywane są do badania przeciwciał anty-B19V klasy IgM oraz IgG, ich stężenia i typów konformacyjnych. Na rynku dostępne są testy immunoenzymatyczne (ELISA) oraz testy Western Blot (Immunoblot).

W niektórych przypadkach wskazana jest ocena przebiegu infekcji B19V z wykorzystaniem badania przeciwciał w kolejnych próbkach. Analiza wyników pozwala ocenić dynamikę zmian ich stężenia oraz dostrzec serokonwersję.

Z punktu widzenia diagnostycznego badania serologiczne są przydatne szczególnie u osób immunokompetentnych (np. w diagnozowaniu rumienia zakaźnego, objawów poliartalgii, u kobiet w ciąży).

1.2. Badania diagnostyczne metodami biologii molekularnej

Metody molekularne oparte na wykrywaniu kwasu nukleinowego wirusa stanowią nowoczesne i czułe narzędzie diagnozujące zakażenie parwowirusem B19. Obecnie stosowane są testy oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych generujące wyniki jakościowe bądź ilościowe. Nowoczesną metodą, współcześnie najczęściej stosowaną, jest reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) wykrywająca pojedyncze kopie wirusa w różnym materiale, np. w pełnej krwi, osoczu, surowicy, płynie owodniowym, tkankach. Metoda ta, wykorzystując techniki fluorescencyjne, pozwala ocenić ilość powstającego produktu reakcji w trakcie jej trwania. Jej zastosowanie umożliwia ilościową analizę wirusa B19V oraz monitorowanie przebiegu zakażenia w czasie, co w konsekwencji pomaga rozgraniczyć infekcje istotne i nieistotne klinicznie, a w przypadku zastosowanego postępowania ograniczającego zakażenie pozwala ocenić jego skuteczność.

1.3. Trudności i ograniczenia diagnostyki laboratoryjnej

Zarówno badania metodami serologicznymi, jak i molekularnymi niosą ze sobą trudności i ograniczenia.

Badania immunoenzymatyczne obarczone są błędem związanym z istniejącym prawdopodobieństwem uzyskania wyników ujemnych u osób zakażonych oraz fałszywie dodatnich. Są to parametry specyficzne dla testów różnych producentów.

UWAGA: Przeciwciała anty-B19V nie są wykrywane w pierwszej fazie zakażenia – w okienku serologicznym – podczas gwałtownej replikacji wirusa prowadzącej do osiągnięcia maksymalnego stężenia DNA B19V.

W niektórych sytuacjach, zwłaszcza kiedy stężenie wirusa jest bardzo wysokie, okres kiedy nie wykrywa się swoistych przeciwciał ulega wydłużeniu. Jest to związane ze zjawiskiem wiązania przeciwciał produkowanych w początkowej fazie zakażenia, które mają charakter neutralizujący, z wirionami B19V. Aktywne domeny przeciwciał determinujące ich swoistość mogą być w takiej sytuacji trudno dostępne i w rutynowym badaniu uzyskuje się wyniki fałszywie negatywne.

Zaobserwowanie serokonwersji umożliwia rozpoznanie rozpoczęcia się fazy przewlekłej zakażenia B19V. Wykrycie wyłącznie przeciwciał klasy IgG nie zawsze pozwala różnicować aktualną infekcję od zakażenia przebytego. Wyniki badań przeciwciał anty-B19V mogą nie być informatywne u osób z obniżoną odpornością, leczonych immunosupresyjnie oraz w diagnozowaniu przypadków zakażenia B19V u płodu.

Diagnostyka zakażenia parwowirusem B19 oparta na technikach biologii molekularnej również niesie ze sobą pewne trudności. Niektóre testy (zarówno komercyjne, jak i tzw. *home-made*) nie wykrywają lub zaniżają stężenie niektórych form polimorficznych, w szczególności genotypu 2 i 3.

UWAGA: Należy używać testów, co do których mamy pewność, że wykrywają wszystkie formy polimorficzne wirusa B19 z taką samą czułością.

Istotne trudności diagnostyczne związane są także z ryzykiem otrzymania wyników fałszywie ujemnych w próbkach z wysoką wiremią B19V.

Z taką sytuacją możemy mieć do czynienia we wczesnej fazie zakażenia lub u osób z obniżoną odpornością, kiedy wiremia dochodzi nawet do 10^{14} IU/ml. Aby uniknąć wydania wyniku fałszywie ujemnego, ważna jest wnikliwa analiza wykresów fluorescencji w trakcie badań metodą real-time PCR.

UWAGA: W przypadku podejrzenia zakażenia B19V ze skrajnie wysoką wiremią ostateczna interpretacja wyniku winna być oparta na analizie rozcieńczonej próbki (zobacz: Pol J Microbiol 2010; 59(2): 129-132).

Ze względu na możliwość wystąpienia wysokiej wiremii w trakcie zakażenia B19V szczególnie ważne jest zachowanie procedur, które ograniczą możliwość kontaminacji. Wygenerowanie wyniku fałszywie dodatniego może nastąpić nie tylko, jak w każdym badaniu techniką PCR, na skutek zanieczyszczenia ujemnej próbki produktem amplifikacji, ale także cząsteczkami wirusa obecnymi w badanym materiale. Do kontaminacji może dojść zarówno w fazie przedanalizacyjnej, jak i podczas izolacji DNA.

Należy zaznaczyć, iż samo wykrycie DNA B19V nie zawsze wskazuje na wczesną fazę infekcji. Niska wiremia B19V może utrzymywać się miesiącami, a nawet latami przy braku jakichkolwiek objawów klinicznych. Dlatego też za-

stosowanie badań ilościowych pozwala na różnicowanie zakażenia ostrego o potencjalnym znaczeniu klinicznym i przewlekłego, do którego mogło dojść nawet wiele lat wcześniej. **W pierwszej fazie zakażenia liczba cząsteczek wirusa B19 jest bardzo wysoka, a następnie spada.** Należy przy tym pamiętać, iż u osób z obniżoną odpornością wysoka wiremia B19V może utrzymywać się dłużej niż u osób immunokompetentnych. **Zmniejszenie ilości wirusa może nastąpić w wyniku terapii mającej na celu podniesienie odporności u chorego,** zwłaszcza odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego, poprzez zmniejszenie dawek leków immunosupresyjnych czy podanie immunoglobulin.

UWAGA: Do oceny przebiegu zakażenia, w tym skuteczności postępowania terapeutycznego, zaleca się monitorowanie stężenia DNA B19V.

2. Zlecenie badania laboratoryjnego

2.1. Medyczne laboratorium diagnostyczne opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecenia badań laboratoryjnych oraz udostępnia formularz zlecenia badania laboratoryjnego zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia o standardach jakości w medycznym laboratorium diagnostycznym. Laboratorium diagnostyczne wykonujące badania dostarcza zleceniodawcy formularz zlecenia badania laboratoryjnego oraz przekazuje informacje dotyczące sposobu pobierania materiału do badań, jego przechowywania i transportu, a następnie zleceniodawca potwierdza pisemnie zapoznanie się z nimi.

2.2. W medycznym laboratorium diagnostycznym jest prowadzona dokumentacja medyczna (w tym zlecenia badań laboratoryjnych), przechowywana i przetwarzana zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.

3. Pobieranie i przygotowanie materiału do badań laboratoryjnych

3.1. Należy ściśle przestrzegać zaleceń producentów odczynników, próbek i używanych systemów pobrania stosowanych do pozyskania materiału do badań (stosowanych antykoagulantów) oraz parametrów wirowania. Systemy służące do pobierania próbek pochodzące od różnych producentów różnią się między sobą, dlatego przestrzeganie warunków postępowania z materiałem biologicznym może mieć istotny wpływ na uzyskane wyniki.

3.2. W przypadku badań serologicznych należy pobierać krew na skrzep (najlepiej do próbki próżniowej z żelem separującym) i po odwirowaniu otrzymaną surowicę przesłać do medycznego laboratorium diagnostycznego wykonującego badanie. Medyczne laboratorium diagnostyczne informuje, jaka objętość próbki jest wymagana, uwzględniając:

1. wymagania producenta stosowanego testu,
2. potencjalne powtórzenie badania w przypadku uzyskania nieważnego wyniku badania,
3. dostępność materiału (objętość pobranej krwi od dziecka/płodu powinna być mniejsza niż od osoby dorosłej). W przypadku braku dostępu do próbki surowicy dopuszcza się wykonanie badania w osoczu (krew pobrana na EDTA w systemie zamkniętym).

3.3. Krew na badania molekularne należy pobierać na skrzep wyłącznie do próbek próżniowych z żelem separującym w systemie zamkniętym i przesłać po odwirowaniu. Otwarcie próbek winno nastąpić dopiero w medycznym laboratorium diagnostycznym wykonującym badanie przy zachowaniu najwyższych procedur chroniących próbki przed zanieczyszczeniem. Takie postępowanie zmniejsza ryzyko kontaminacji na etapie przedanalizy i ogranicza prawdopodobieństwo wyników fałszywie dodatnich. Dopuszcza się wykonanie badania w osoczu, przy czym należy stosować próbki z antykoagulantem – EDTA. Nie wolno pobierać krwi do próbek z antykoagulantami będącymi inhibitorami PCR (np. z heparyną). Objętość pobranego materiału powinna uwzględniać czynniki podane w pkt. 3.2.

W przypadku zlecenia na badanie serologiczne i molekularne w jednej próbce u tego samego pacjenta należy wyłącznie pobierać krew (na skrzep lub EDTA) do próbek próżniowych.

3.4. Probówka z pobranym materiałem powinna zawierać następujące dane pacjenta:

1. imię i nazwisko,
2. PESEL,
3. datę pobrania,
4. kod paskowy.

4. Transport materiału do badań

4.1. Informacje dotyczące pobierania materiału do badań, jego przechowywania i transportu.

Należy pamiętać, iż rodzaj badanego materiału (surowica lub osocze), system pobierania i transport muszą być zawsze zwalidowane ze stosowanym testem diagnostycznym celem uniknięcia błędów przedanalizy i zapewnienia wiarygodnych wyników zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.]. Warunki i czas transportu krwi muszą spełniać zalecenia medycznego laboratorium diagnostycznego wykonującego badania (patrz pkt. 2.1.).

4.2. Materiał do badań laboratoryjnych jest traktowany jako potencjalnie zakaźny i musi być przesyłany do medycznego laboratorium diagnostycznego zgodnie z zasadami transportu materiału zakaźnego. W skrócie – szczelny pojemnik z materiałem biologicznym powinien być umieszczony w większym pojemniku zabezpieczającym przed zgnieceniem i zawierającym absorbent wchłaniający materiał biologiczny w przypadku ewentualnego uszkodzenia próbki. Ten pojemnik należy następnie umieścić w opakowaniu z odpowiednimi wkładami chłodzącymi umożliwiającymi zachowanie wymaganej temperatury w czasie transportu oraz oznakowanym „materiał zakaźny”.

5. Przyjmowanie materiału do badań

5.1. Medyczne laboratorium diagnostyczne opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i oznakowania materiału do badań.

5.2. Medyczne laboratorium diagnostyczne sprawdza zgodność danych ze zlecenia z oznakowaniem materiału oraz przydatność materiału do badania.

5.3. W przypadku stwierdzenia przez medyczne laboratorium diagnostyczne niezgodności otrzymanego materiału z wymaganiami dotyczącymi pobierania, transportu lub innych nieprawidłowości powodujących, że materiał nie może być wykorzystany do badania, pracownik zgłasza ten fakt kierownikowi medycznego laboratorium diagnostycznego lub osobie przez niego upoważnionej, którzy w razie potwierdzenia niezgodności mogą zakwalifikować materiał jako niezdatny do badania i odmówić wykonania badania. Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji. Dalsze postępowanie medyczne laboratorium diagnostyczne uzgadnia ze zleceniodawcą.

5.4. Medyczne laboratorium diagnostyczne prowadzi dokumentację dotyczącą sposobu postępowania z materiałem biologicznym przed i po wykonaniu badania. W przypadku archiwizacji próbek uwzględnia się miejsce, czas oraz temperaturę ich przechowywania.

6. Wymagania dotyczące stosowanej aparatury i testów diagnostycznych

6.1. Do diagnostyki medycznej *in vitro* należy stosować wyroby medyczne, tj. aparaturę i testy diagnostyczne spełniające wymagania określone w ustawie o wyrobach medycznych. W związku z powyższym, aparatura i odczynniki muszą posiadać deklarację zgodności z dyrektywą 98/79/EC. Tego rodzaju certyfikat, jak również inne certyfikaty renomowanych instytucji zajmujących się ochroną

zdrowia (np. FDA) służą potwierdzeniu jakości produktu służącego do laboratoryjnych badań markerów zakażenia B19V.

6.2. Stosowane testy diagnostyczne powinny spełniać wymagania zasadnicze określone przez Ministra Zdrowia. Powyższe musi być potwierdzone wpisem do bazy danych o wyrobach medycznych przeznaczonych do używania w Rzeczypospolitej Polskiej prowadzonej przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Prezes tego urzędu udziela informacji publicznej o zawartości bazy na wniosek producenta lub medycznego laboratorium diagnostycznego, stąd zaleca się weryfikację czy usługodawca spełnia wymagania gwarantujące jakość oferowanego produktu.

6.3. Stosowanie testów PCR wytworzonych przez medyczne laboratorium diagnostyczne (typu *home-made*) jest możliwe wyłącznie po przeprowadzeniu pełnej walidacji metody ze szczególnym uwzględnieniem czułości i swoistości.

6.4. Wyroby medyczne (aparaty i/lub odczynniki) powinny być właściwie dostarczone, prawidłowo zainstalowane i utrzymywane oraz używane zgodnie z przewidzianym zastosowaniem, a użytkownik jest obowiązany do przestrzegania instrukcji użytkowania. Badania należy wykonywać i interpretować ich wyniki zgodnie z instrukcją producenta testów diagnostycznych.

6.5. Wymagania dotyczące testów wykrywających DNA parwowirusa B19

Badania metodami biologii molekularnej charakteryzują się bardzo wysoką czułością i wykorzystywane są do wykrywania obecności DNA wirusa B19 w surowicy lub osoczu. Niektóre testy są dopuszczone do wykonywania badań w pełnej krwi oraz płynie owodniowym.

6.5.1. Zaleca się stosowanie metody ilościowej do wykrywania DNA B19V. Ten rodzaj badania umożliwia odróżnienie przewlekłego zakażenia, relatywnie częstego w populacji, zazwyczaj charakteryzującego się niską DNA-emią (<10⁴ IU/ml) i nie związanego z objawami klinicznymi, od zakażenia w ostrej fazie z wysoką DNA-emią, której mogą towarzyszyć objawy chorobowe.

6.5.2. Czułość analityczna testu oraz wynik badania powinny być wyrażane **w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml)**. Taki sposób wyrażania wyniku oraz charakterystyki testu umożliwia zarówno porównywanie testów, jak i wyników uzyskiwanych różnymi testami, w różnych medycznych laboratoriach diagnostycznych.

6.5.3. Test stosowany do wykrywania DNA B19V **musi wykrywać wszystkie znane genotypy wirusa (1-3) z taką samą czułością**. Czułość analityczna wykrywania form polimorficznych wyrażona w 95% LOD (*limit of detection* – granica wykrywalności), w IU/ml musi być potwierdzona przez producenta testu odpowiednimi dokumentami.

6.5.4.

W przypadku monitorowania DNA-emii B19V konieczne jest **analizowanie tego samego rodzaju materiału biologicznego** (np. tylko surowicy lub tylko pełnej krwi) ze względu na różnice stężenia B19V w różnych materiałach biologicznych.

6.5.5. Należy stosować wyłącznie testy wyposażone w kontrolę wewnętrzną (IC – internal control). W przypadku uzyskania wyniku negatywnego IC konieczne jest wdrożenie postępowania wskazanego przez producenta testu. Dodatkowo, badanie rozcieńczonej próbki umożliwia identyfikację zakażenia w przypadku wyniku fałszywie ujemnego, któremu towarzyszył wynik negatywny IC spowodowany wysoką wiremią B19V.

6.5.6. W przypadku każdego wyniku ujemnego należy przeprowadzać **analizę krzywej fluorescencji reakcji real-time PCR**. Takie działanie umożliwia identyfikację wyników fałszywie ujemnych będących następstwem wiremii przekraczającej górny próg liniowości testu ilościowego.

6.5.7. Medyczne laboratorium diagnostyczne jest zobowiązane do wykonywania minimum 100 badań ilościowych DNA B19V na rok w celu zapewnienia wymaganej jakości wykonywanych badań molekularnych.

6.5.8. Należy zachować procedury ograniczające kontaminację ze względu na możliwość diagnozowania próbek z wysoką wiremią B19V.

6.6. Wymagania dotyczące testów wykrywających przeciwciała skierowane do parwowirusa B19

UWAGA: W przypadku badań serologicznych bardzo istotna jest jakość stosowanych testów diagnostycznych. Polskie doświadczenia wykazały, że używanie nieodpowiednich testów prowadzi do otrzymywania większej liczby wyników fałszywych/nieinformatywnych.

W doborze odpowiednich testów pomocne jest śledzenie aktualnego piśmiennictwa naukowego, w którym na podstawie badań prowadzonych w niezależnych ośrodkach naukowych publikowane są analizy dotyczące charakterystyki/porównania dostępnych na rynku testów do oznaczania przeciwciał anty-B19V.

6.6.1. Przy wyborze testu należy przede wszystkim brać pod uwagę **swoistość**, czułość oraz powtarzalność i odtwarzalność uzyskiwanych wyników. Jest to bardzo istotne w badaniu przeciwciał klasy IgM, które są markerem ostrego zakażenia.

6.6.2. W przypadku badania przeciwciał klasy IgG, wynik ilościowy pomaga w różnicowaniu zakażenia przewlekłego i niedawno przebytego.

7. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych

7.1. Medyczne laboratorium diagnostyczne prowadzi wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczy w zewnętrznej kontroli jakości zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia co najmniej raz w roku.

7.2. Za prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości oraz uczestnictwo w programach zewnętrznej kontroli jakości odpowiada kierownik medycznego laboratorium diagnostycznego lub wyznaczony przez niego pracownik.

7.3. Dokumentacja kontroli jakości badań jest przechowywana przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.



8. Algorytm postępowania diagnostycznego oraz ogólne zasady interpretacji wyników

8.1. Diagnostyka zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży winna łączyć badania:

- ❑ **swoistych przeciwciał, zarówno klasy IgG jak i IgM, metodami immunoezymatycznymi oraz**
- ❑ **DNA B19V metodami biologii molekularnej.**

8.2. Sposób prowadzenia laboratoryjnej diagnostyki zakażenia B19V u kobiet w ciąży został przedstawiony na Schemacie nr 1.

8.2.1. W sytuacji, kiedy **przeciwciała anti-B19V nie są wykrywane** u kobiety ciężarnej, jedynym instrumentem diagnostycznym potwierdzającym infekcję jest badanie metodą biologii molekularnej. Ma to szczególne znaczenie u kobiet krótko po ekspozycji na zakażenie – w okienku serologicznym.

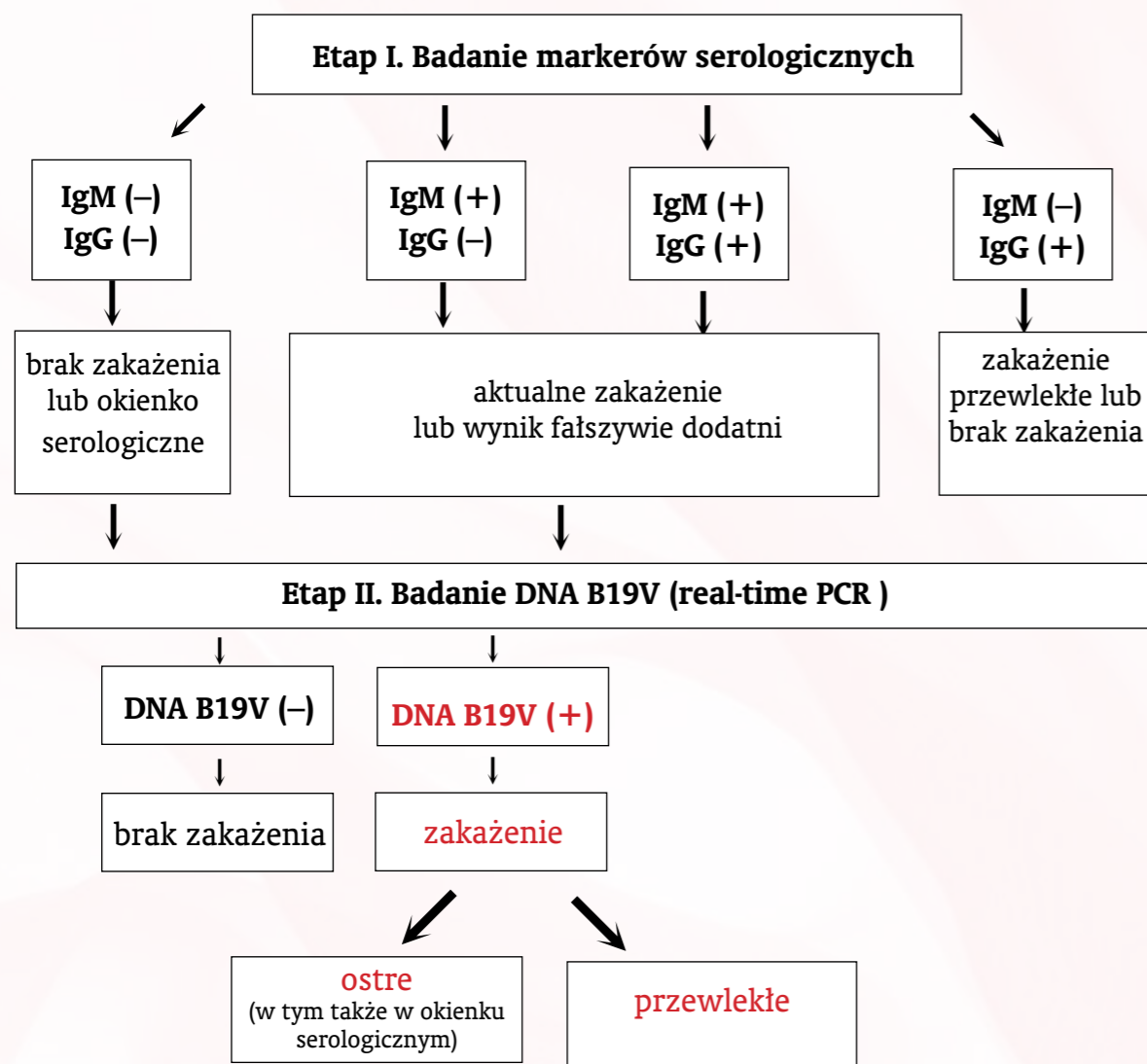
UWAGA: Badanie przeciwciał anti-B19V należy wykonywać nie wcześniej niż 2 tygodnie po kontakcie z osobą zakażoną, np. z rumieniem zakaźnym.

8.2.2. W przypadku **wykrycia przeciwciał anti-B19V klasy IgM bądź jednocześnie IgM i IgG**, badanie real-time PCR pozwoli potwierdzić aktualną infekcję, a tym samym może być pomocne w podjęciu decyzji co do dalszego postępowania terapeutycznego.

Uwaga: Swoistość pierwotnego wyniku dodatniego w klasie IgM musi być potwierdzona wykryciem DNA B19V lub/i udokumentowaniem serokonwersji.

8.2.3. Wobec **wykrytych przeciwciał anti-B19V klasy IgG** u kobiety ciężarnej aktualną infekcję można wykluczyć **jedynie wykonując badanie metodą biologii molekularnej**. W przypadku potwierdzenia obecności DNA B19V, wynik badania ilościowego pomaga rozstrzygnąć czy mamy do czynienia z zakażeniem, do którego doszło w ciągu ostatnich kilku miesięcy czy też z zakażeniem przewlekłym.

Schemat 1. Algorytm postępowania diagnostycznego u kobiet w ciąży z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19



8.3. Postępowanie diagnostyczne u płodów z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19 powinno opierać się na badaniu real-time PCR. Ze względu na niedojrzałość układu immunologicznego u płodu, a co za tym idzie możliwość braku produkcji przeciwciał neutralizujących, diagnostyka B19V metodami serologicznymi może nie potwierdzać wewnątrzmacicznego zakażenia B19V (przeniesienia infekcji od matki do dziecka).

Uwaga: W sytuacji wystąpienia powikłań u płodu, monitorowanie DNA-emii B19V może być pomocne w podjęciu decyzji o postępowaniu leczniczym (np. podanie transfuzji dopłodowej czy immunoglobulin).

9. Formułowanie, interpretacja i wydawanie wyników

9.1. Formularz sprawozdania z badań parwowirusa B19 musi być zgodny z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej.

9.2. Wyniki badania markerów zakażenia B19V muszą być autoryzowane przez diagnostę laboratoryjnego posiadającego odpowiednią specjalizację lub/i co najmniej dwuletnie doświadczenie w tej dziedzinie diagnostyki lub lekarza będącego jednocześnie diagnostą laboratoryjnym czy też, posiadającego wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11.12.2012 roku w sprawie wykazu specjalizacji uprawniających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym [Dz.U. 2012 poz. 1420] i posiadającego co najmniej dwuletnie doświadczenie w tej dziedzinie diagnostyki.

Uwaga: W przypadku badań DNA B19V osoba autoryzująca wynik powinna legitymować się doświadczeniem w diagnostyce molekularnej wirusów.

9.3. Interpretacja uzyskanych wyników badań przeciwciał anti-B19V klasy IgM i IgG oraz formułowanie wyniku na sprawozdaniu muszą być zgodne z zaleceniami producenta dostępnymi w ulotce załączonej do testu. Wyniki są jakościowe lub ilościowe, wyrażane w jednostkach na mililitr [U/ml] i interpretowane są w następujący sposób:

- dodatni (+) (odpowiednio w klasie IgM lub IgG) – co oznacza: stwierdzono obecność przeciwciał (odpowiednio w klasie IgM lub IgG),**
- ujemny (-) – nie stwierdzono obecności przeciwciał (odpowiednio w klasie IgM lub IgG),**
- wątpliwy (+/-) (odpowiednio w klasie IgM lub IgG) – przeciwciała na granicy wartości wyniku dodatniego i ujemnego (odpowiednio w klasie IgM lub IgG).**

Wynik najlepiej wyrażać w jednostkach międzynarodowych, gdyż wówczas możliwe jest porównanie rezultatów badań różnymi testami oraz interpretowanie ich w oparciu o piśmiennictwo światowe posługujące się tymi samymi jednostkami. W przypadkach stosowania innych jednostek te same wartości mogą być nieporównywalne.

9.4. Wyniki badań ilościowych DNA B19V muszą zawierać informację o rodzaju badanego materiału, a także muszą być podawane **w jednostkach międzynarodowych [IU/ml]**. Są one interpretowane w następujący sposób:

- wykryto DNA B19V – obecny parwowirus B19 u kobiety ciężarnej – wartość stężenia podana w IU/ml (aktualne zakażenie B19V – poziom DNA-emii pomaga w rozstrzygnięciu, czy mamy do czynienia z zakażeniem toczącym się od niedawna, czy ma ono charakter przewlekły),**

❑ **nie wykryto DNA B19V – brak parwirusa B19 w materiale biologicznym pobranym od kobiety ciężarnej (brak aktualnego zakażenia B19V).**

9.5. Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań prawnych.

9.6. Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje wyniki przez czas określony w przepisach dotyczących dokumentacji medycznej [rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej].

W Tabeli 1 dodatkowo przedstawiono postępowanie diagnostyczne w sytuacji szczególnej – gdy badanie DNA B19V nie jest dostępne.

10. Postępowanie w przypadku stwierdzenia zakażenia B19V u kobiety w ciąży

10.1. W przypadku stwierdzenia zakażenia (patrz Schemat 1, Tabela 1) na sprawozdaniu z badania należy umieścić komentarz **”Pacjentka w ciąży, u której potwierdzono zakażenie powinna zostać skierowana do ośrodka położniczego na III poziomie referencyjności w celu przeprowadzenia dalszej specjalistycznej diagnostyki oraz monitorowania stanu zdrowia”**. W ośrodku położniczym na III poziomie referencyjności płód będzie monitorowany w kierunku objawów niedokrwistości poprzez wykonanie badania ultrasonograficznego, w tym MCA-PSV (zazwyczaj 1 raz w tygodniu aż do 20 tygodnia ciąży po ekspozycji na zakażenie B19V). W przypadku stwierdzenia obrzęku uogólnionego płodu bądź podejrzenia niedokrwistości (wzrost MCA PSV > 1,5 wielokrotności mediany – MoM) konieczne jest skierowanie pacjentki do specjalistycznego ośrodka, w którym będzie możliwe podjęcie leczenia wewnątrzmacicznego płodu obejmującego wykonanie transfuzji dopłodowej.



Tabela 1. Zasady interpretacji wyników markerów serologicznych zakażenia B19V u kobiet w ciąży oraz wskazanie dalszego postępowania diagnostycznego w przypadku braku dostępu do badania DNA B19V (sytuacja szczególna)

IgM	IgG	Interpretacja wyniku	Dalsze postępowanie diagnostyczne w przypadku braku dostępu do badania DNA B19V (sytuacja szczególna)
-	-	Brak zakażenia, pacjentka nie przechodziła zakażenia lub wczesny etap zakażenia (okienko serologiczne)	Wykluczenie/potwierdzenie zakażenia – powtórzenie badania swoistych IgM i IgG za 2 tygodnie
+	-	Wczesny etap zakażenia	Potwierdzenie zakażenia – powtórzenie badania swoistych IgM i IgG za miesiąc (powinny pojawić się IgG)
+	+	Wczesny etap zakażenia	Potwierdzenie zakażenia – powtórzenie badania swoistych IgM i IgG za miesiąc w celu obserwacji serokonwersji (zanik IgM przy wzroście stężenia IgG)
-	+	Aktualne zakażenie lub zakażenie przebyte w przeszłości	Brak możliwości wykluczenia/potwierdzenia zakażenia bez wykonania badania DNA B19V

10.2. Prenatalne podejrzenie niedokrwistości u płodu postawione na podstawie nieprawidłowych przepływów w tętnicy środkowej mózgu płodu – MCA PSV (z towarzyszącym lub nie obrzękiem płodu) jest wskazaniem do pobrania krwi płodu.

Uwaga: U płodów monitorowanych z powodu podejrzenia zakażenia/infekcji B19V pobiera się próbkę krwi w celu oznaczenia parametrów morfologicznych (stężenie hemoglobiny, liczba płytek krwi oraz retikulocytów) oraz wykonania badania DNA B19V i potwierdzenia przeniesienia zakażenia B19V od matki do płodu.

Dalsze postępowanie uzależnione jest od stanu płodu i wyników badań laboratoryjnych. Najczęściej, w przypadku niedokrwistości spowodowanej zakażeniem B19V, wystarczającym postępowaniem jest jedna/dwie transfuzje dopłodowe. Istotnym czynnikiem rokowniczym wydaje się być liczba erytroblastów we krwi obwodowej, ponieważ wysoka erytroblastoza wskazuje na możliwość samoistnej regeneracji układu czerwokrwinkowego. U płodów z ciężkim obrzękiem uogólnionym, kardiomegalią i objawami niewydolności serca można dodatkowo rozważyć leczenie wspomagające digoksyną.

10.3. Kobiety ciężarne leczone z powodu poważnych następstw parwirozy u płodu powinny znajdować się pod ścisłym nadzorem lekarskim, ponieważ obrzęk uogólniony płodu może stanowić zagrożenie dla kobiety ciężarnej w mechanizmie rozwoju tzw. zespołu lustrzanego („mirror syndrome”).

Uwaga: Wystąpienie objawów tzw. zespołu lustrzanego u kobiety ciężarnej, przy utrzymywaniu się objawów u płodu (obrzęki uogólnione, w krańcowym stadium niewydolność oddechowo-kръżeniowa) jest stanem zagrożenia życia i jest uważane za wskazanie do zakończenia ciąży.

Piśmiennictwo

1. Baylis S.A., Buchheit K.H. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97(1): 13-20.
2. Baylis S.A., Fryer J.F., Grabarczyk P. Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: implications for the quantification of different virus genotypes. *J. Virol. Methods.* 2007; 139(1): 97-99.
3. Baylis S.A., Shah N., Minor P.D. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J. Virol. Methods.* 2004; 121: 7-16.
4. Bonvicini F., Chiara Puccetti Ch., Salfi N.C.M., Guerra B., Gallinella G., Rizzo N., Zerbini M. Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(10): 3514-3518.
5. Bredl S., Plentz A., Wenzel J.J., Pfister H., Möst J., Modrow S. False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 2011; 51(2): 115-120.
6. Brojer E., Grabarczyk P., Kalińska A. Molekularne metody diagnostyki zakażenia parwowirusem B19 u ciężarnych. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* 2009; 2(3): 212-214.
7. Candotti D., Etiz N., Parsyan A. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004; 78: 12169-12178.
8. Cohen B. J., Gandhi J., Clewley J.P. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: 152-155.
9. Corcoran A., Kerr S., Elliott G., Koppelman M., Doyle S. Improved detection of acute parvovirus B19 infection by immunoglobulin M EIA in combination with a novel antigen EIA. *Vox Sang.* 2007; 93(3): 216-222.
10. de Jong E.P., de Haan T.R., Kroes A.C.M., Beersma M.F.C., Oepkes D., Walther F.J. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: 1-7.
11. de Jong E.P., Walther F.J., Kroes A.C.M., Oepkes D. Parvovirus B19 infection in pregnancy: new insights and management. *Prenat. Diagn.* 2011; 31: 419-425.
12. Ekman A., Hokynar K., Kakkola L. i wsp. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J. Virol.* 2007; 81(13): 6927-6935.
13. Enders M., Klingel K., Weidner A., Baisch C., Kandolf R., Schalasta G., Enders G. Risk of fetal hydrops and non-hydropic late intrauterine fetal death after gestational parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 2010; 49: 163-168.
14. Enders M., Schalasta G., Baisch C., Weidner A., Pukkila L., Kaikkonen L., Lankinen H., Hedman L. et al. Human parvovirus B19 infection during pregnancy – value of modern molecular and serological diagnostics. *J. Clin. Virol.* 2006; 35: 400-406.
15. Enders M., Weidner A., Zoellner I., Searle K., Enders G. Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat. Diagn.* 2004; 24: 513-518.
16. Engel K., Grabarczyk P., Celewicz Z., Grzymała-Figura A., Węgrzynowski J., Brojer E. Obrzęk uogólniony płodu w przebiegu zakażenia parwowirusem B19, opis przypadku. *Ginekol. Pol.* 2012; 83: 141-144.
17. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Editors). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2005, Elsevier Academic Press.

18. Grabarczyk P., Korzeniowska J., Liszewski G., Kalińska A., Sulkowska E., Krug-Janiak M., Kopacz A., Łętowska M., Brojer E. Badanie DNA parwowirusa B19 (B19V) u polskich dawców krwi, 2004-2010. *Przegl. Epidemiol.* 2012; 66(1): 7-12.
19. Grabarczyk P., Kalińska A., Kara M., Wieczorek R., Ejduk A., Sulkowska E., Gołębiowska-Staroszczyk S., Matysiak M., Baylis S.A., Brojer E. Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland. *J. Med. Virol.* 2011; 83: 142-149.
20. Grabarczyk P., Kalińska A., Sulkowska E., Brojer E. False negative results in high viremia Parvovirus B19-samples tested with real-time PCR. *Pol. J. Microbiol.* 2010; 59(2): 129-132.
21. Heegaard E.D., Brown K.E. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(3): 485-505.
22. Kerr J.R., Cotmore S.F., Bloom M.E., Linden M.R., Parrish C.R. [edit.]. *Parvoviruses*. Hodder Arnold, Great Britain 2006.
23. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Klim S.K., Uldbjerg N., Romero R. Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2011; 118: 175-186.
24. Lee T.H., Kleinman S.H., Wen L., Montalvo L., Todd D.S., Wright D.J., Tobler L.H., Busch M.P. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). Distribution of parvovirus B19 DNA in blood compartments and persistence of virus in blood donors. *Transfusion.* 2011; 51(9): 1896-1908.
25. Lefrère J.J., Servant-Delmas A., Candotti D., Mariotti M., Thomas I., Brossard Y., Lefrère F., Girot R., Allain J.P., Laperche S. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood.* 2005; 106(8): 2890-2895.
26. Lenkiewicz B., Roszkowski T., Grabarczyk P., Moraczewska Z., Brojer E., Żupańska B. Diagnostyka zakażenia Parwowirusem B19 w nieimmunologicznym obrzęku płodu. *Ginekol. Pol.* 1998; 69(4): 176-181.
27. Marcinek P., Nowakowska D., Szaflik K., Spiewak E., Małafiej E., Wilczyński J. Analysis of complications during pregnancy in women with serological features of acute toxoplasmosis or acute parvovirus. *Ginekol. Pol.* 2008; 79(3): 186-191.
28. Matsuda H., Sakaguchi K., Shibasaki T., Takahashi H., Kawakami Y., Furuya K. Intrauterine therapy for parvovirus B19 infected symptomatic fetus using B19 IgG-rich high titer gammaglobulin. *J. Perinat. Med.* 2005; 33: 561-563.
29. Matsukura H., Shibata S., Tani Y., Shibata H., Furuta R.A. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion.* 2008; 48(5): 1036-1037.
30. Mossong J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., Siennicka J., Trzcinska A., VAN Damme P., Beutels P., Vyse A., Shkedy Z., Aerts M., Massari M., Gabutti G. Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136(8): 1059-1068.
31. Oszukowski P., Małafiej E., Pertyński T. i wsp. Infection with parvovirus B19 in pregnant women. *Ginekol. Pol.* 1996; 67(3): 114-116.
32. Parsyan A., Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion – an update. *Transf. Med.* 2007; 17(4): 263-278.
33. Schmidt M., Themann A., Drexler C., Bayer M., Lanzer G., Menichetti E., Lechner S., Wessin D., Prokoph B., Allain J.P., Seifried E., Hourfar M.K. Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion.* 2007; 47(10): 1775-1782.
34. Siennicka J., Stefanoff P., Trzcinska A., Rosińska M., Litwińska B. Przegląd serologiczny w kierunku zakażenia parwowirusem B19 w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60: 571-580.
35. Siennicka J., Trzcinska A. Comparison of three enzyme immunoassays used to detect human parvovirus B19-specific IgM antibodies in sera of people suspected of measles. *Med. Sci. Monit.* 2010; 16(5): BR154-BR159.
36. Weiffenbach J., Bald R., Gloning K.P. et al. Serological and virological analysis of maternal and fetal blood samples in prenatal human parvovirus B19 infection. *J. Infect. Dis.* 2012; 205: 782-788.
37. Young N.S., Brown K.E. Mechanisms of disease. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(6): 586-597.