

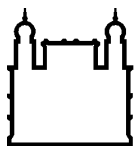
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARVOVIRUS HUMANO B19 EM  
DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS: DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL E ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA  
INFECÇÃO AGUDA E PERSISTENTE

ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES

Rio de Janeiro  
Abril de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical**

*ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES*

Avaliação da infecção por Parvovírus Humano B19 em diferentes grupos populacionais: Diagnóstico diferencial e aspectos imunopatogênicos da infecção aguda e persistente

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciência.

**Orientadores:** Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Luciane Almeida Amado Leon  
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2022

Daniel Rocha Alves, Arthur.

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS HUMANO B19 EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA INFECÇÃO AGUDA E PERSISTENTE / Arthur Daniel Rocha Alves. - Rio de Janeiro, 2022.

190 f.; il.

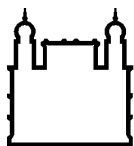
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

Orientadora: Luciane Almeida Amado Leon.

Co-orientador: Marcelo Alves Pinto.

Bibliografia: f. 124-142

1. Parvovirus humano B19. 2. Infecção aguda. 3. Infecção persistente. 4. Diagnóstico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical**

***AUTOR: ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES***

### **AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS HUMANO B19 EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA INFECÇÃO AGUDA E PERSISTENTE**

**ORIENTADORES:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Almeida Amado Leon  
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

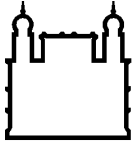
**Aprovada em:** 28 / 04 / 2022

#### **EXAMINADORES:**

<b>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Carvalho de Sequeira</b>	Presidente (IOC-FIOCRUZ)
<b>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana dos Santos Barbosa Netto</b>	Membro externo (INI-FIOCRUZ)
<b>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzia Maria de Oliveira Pinto</b>	Membro interno (IOC-FIOCRUZ)
<b>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Regina Lopes dos Santos</b>	Suplente externo (UFRRJ)
<b>Prof. Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior</b>	Suplente interno (IOC-FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2022





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Medicina Tropical de **Arthur Daniel Rocha Alves**, sob orientação da Dra. Luciane Almeida Amado Leon e co-orientação do Dr. Marcelo Alves Pinto. Ao vigésimo oitavo dia do mês de abril de dois mil vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **“Avaliação da infecção por Parvovírus Humano B19 em diferentes grupos populacionais: Diagnóstico diferencial e aspectos imunopatogênicos da infecção aguda e persistente”**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Patricia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Juliana dos Santos Barbosa Netto – INI/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto – IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Débora Regina Lopes dos Santos – UFRRJ/RJ e Dr. Ivanildo Pedro Sousa Junior – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr<sup>a</sup>. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de abril de 2022.

Dra. Patricia Carvalho de Sequeira (Presidente da Banca):

Dra. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa):

Patricia C. Sequeira, PhD  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ  
Matriculada 1991978

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentoseac@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentoseac@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

Dedico este trabalho aos meus pais Rita de Cássia da Rocha Alves e Daniel Ferreira Alves!

v

## **AGRADECIMENTOS**

Nesses mais de 50 meses de doutorado muitas coisas aconteceram e vem acontecendo (inclusive uma pandemia), essa lista de agradecimento com certeza será enorme, pois esse trabalho só ocorreu graças ao apoio de muitas mãos, peço, de antemão, sinceras desculpas caso eu esqueça de alguém.

Em primeiro lugar, como não poderia deixar de ser, gostaria de agradecer aos meus pais Daniel Ferreira Alves e Rita de Cássia da Rocha Alves, a quem eu dedico esse trabalho, por serem a minha fortaleza e escutarem inúmeras vezes assuntos completamente alheios a realidade deles. Eles já sabem, por exemplo, como o Parvovirus B19 replica e as manifestações clínicas relacionadas a esse vírus tão pouco conhecido e comentado na sociedade.

À minha orientadora Dra. Luciane Almeida Amado Leon e ao meu co-orientador Dr. Marcelo Alves Pinto que sempre acreditaram no potencial desse trabalho (e no meu próprio) e me orientaram sempre nos caminhos a seguir, desde o conturbado começo até o conturbado “final”.

Ao curso de pós-graduação em Medicina Tropical (PGMT), que me acolheu super bem, com as incríveis coordenadoras do período do meu doutorado, Dra. Martha Mutis e Dra. Vanessa de Paula, todos os professores do programa. Um agradecimento especial a secretária do programa, Livia Agualuza Mangeon, que sempre está disposta a me ajudar. Uma amizade que com certeza levarei para a vida.

Nesse momento também preciso fazer um agradecimento especial à todas as chapas de representantes discentes (RDs) da PGMT e do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) durante o período que, em prol de toda a comunidade de discentes, trabalhamos sempre juntos. Foi um prazer assistir todos os processos seletivos e reuniões da comissão de pós-graduação (CPG), eu aprendi muito com todo o trabalho. Agradeço em especial a minha amiga Thamiris Balthazar que me convidou para fazer parte dos RDs da PGMT.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A todos os colaboradores dos artigos que foram frutos dessa tese. Um agradecimento em especial a Dra. Lívia Melo Villar, a Dra. Vanessa Salete de Paula e também a Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, que teve um papel fundamental para a discussão de todos os artigos que publicamos juntos, além disso, me acolheu super bem em sua disciplina de virologia no período do estágio em docência.

A todos os locais que nos acolheram para coletar amostras e dados para gerar os artigos: Hospital Federal de Bonsucesso, Hospital Getúlio Vargas Filho, Hospital Universitário Antônio Pedro, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Instituto Fernandes Figueira, Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio) ocorreram os artigos (HFB, Clínicas, HGVF, INI)

À banca examinadora, Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira, Dra. Juliana dos Santos Barbosa Netto, Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto, Dra. Débora Regina Lopes dos Santos e Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior, por todas as críticas construtivas a fim de promover melhorias no estudo.

À Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, em especial a Plataforma de sequenciamento de DNA e de qPCR pela realização dos referidos experimentos. Cabe um agradecimento especial ao Dr. Otacílio da Cruz Moreira, chefe da plataforma de qPCR, por todas as discussões de experimentos.

Aos discentes de IC, mestrado e doutorado, tecnologistas e servidores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) por todas as edificantes discussões em momentos banais do dia-a-dia. É impressionante como grandes descobertas são feitas em conversas informais!

Aos discentes que tive a oportunidade de co-orientar durante o período do doutorado, Barbara Langella, Carol Sathler e Wagner Coelho, espero que vocês tenham aprendido um pouco comigo, pois eu aprendi muito com vocês!

Às minhas ex-colegas de laboratório e agora amigas muito queridas, Jéssica Vasques Raposo e Fernanda de Oliveira Bottino, amigas que estão sempre dispostas a conversar e ajudar em qualquer momento do dia e da noite. Agora começamos a dividir orientações para as novas gerações de discentes, nunca irão nos parar!

Aos meus amigos Amanda Figueira, Ana Carolina Guimarães, Anne Paiva, Juan Campos, Maria Clara Baptista, Mariana Magaldi, Raíssa Deodato, Renata

Malachini e os Thiagos (Chagas e Peixoto). Como uma disciplina de um mês, todos os dias e durante todo o dia faz você ter amigos de maneira tão forte!

Aos meus amigos Filipe de Mesquita Santana, Larissa Cristina Duarte Corrêa, Pedro Henrique Duque Teixeira e Thaís Rodrigues Ribeiro que mesmo tendo vindo em momento diferentes da minha vida, hoje me ajudam em conjunto a mostrar que o mundo é muito maior que as fronteiras da Fiocruz.

À toda a equipe do PrInt-FIOCRUZ-CAPES que resolveram todos os documentos necessários para o meu doutorado sanduíche em tempo recorde, sempre dispostas a ajudar. Um agradecimento também a técnica da CAPES da minha bolsa no exterior, Maria Francisca de Araújo, que sempre respondeu todas as angustiantes mensagens que enviei.

Ao meu supervisor do período de doutorado sanduíche na Universidade de Bolonha Dr. Giorgio Gallinella. Foi uma sensação incrível ter uma dúvida sobre Parvovirus B19 durante a construção desse documento e sanar essa dúvida com o maior parvirologista de todo o mundo. Também preciso fazer um agradecimento especial a Dra. Elisabetta Manaresi, que me acompanhou na bancada e discutiu todos os resultados comigo.

Além disso, gostaria de agradecer a todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade de Bolonha Dra. Francesca Bonvicini, Dra. Gloria Bua, Alessandro Reggiani, Erika Fasano, Elena Cavassi, Stefano.

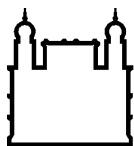
Bolonha também me deu amigos que levarei para toda a vida, os brasileiros Victor Dornelles, Maria Isabel e as Marianas (Lages e Machado) e os italianos Lorenzo Biagi, Tommaso Ognibene, Mattia Vellani, Fabio Carletti e Federica Cucè.

A todos os servidores, alunos e trabalhadores da Fundação Oswaldo Cruz, do Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, da Pós-graduação em Medicina Tropical e da Secretaria Acadêmica do IOC.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência”.**

**Henry Ford**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARVOVÍRUS HUMANO B19 EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS DA INFECÇÃO AGUDA E PERSISTENTE

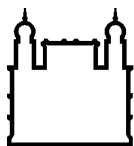
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Arthur Daniel Rocha Alves

A infecção pelo Parvovírus B19 (B19V) pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, de todas as faixas etárias, e se caracteriza por ser aguda e autolimitada, podendo levar a quadros de doença exantemática (DE), doença febril aguda (DFA), doença renal crônica (DRC) e falência hepática aguda (FHA). O diagnóstico diferencial de B19V nessas populações, muitas vezes, não ocorre e estudos sobre a prevalência do B19V são antigos e escassos, não refletindo a atualidade. Marcadores da infecção podem ser detectados na circulação e em diferentes tipos de tecidos, inclusive em tecidos não eritroides, por meses ou anos. A infecção pode levar a manifestações clínicas graves, que requer tratamento hospitalar, e a doenças inflamatórias atípicas, como: cardiomiopatia, artrite reumatoide, hepatite e vasculite. No entanto, a detecção de B19V DNA não implica necessariamente na presença de vírions infecciosos e na associação do B19V com essas manifestações atípicas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi otimizar técnicas de PCR em tempo real para quantificação do B19V DNA e de detecção de partículas virais infecciosas, a fim de realizar o diagnóstico diferencial da infecção pelo B19V em pacientes com DE, DFA, DRC e FHA. Para o diagnóstico da infecção, amostras de diferentes populações foram testadas: DE (n=54), DFA (n=60), DRC (n=221), e FHA (n=30). Amostras de soro (e de tecido hepático para FHA) foram submetidas a avaliação de marcadores sorológicos (IgM e IgG anti-B19V) e moleculares do B19V, a fim de determinar a fase da infecção em que o paciente se encontrava. Para a avaliação de marcadores moleculares, a metodologia de PCR quantitativo e em tempo real foi otimizada e permitiu um diagnóstico sensível e específico do B19V DNA. Além disso, a presença de vírions em amostras de pacientes com B19V (n=10) e de macacos cynomolgus (n=4) infectados experimentalmente foram avaliadas por meio da técnica de pré-tratamento das amostras com uma enzima endonuclease. O teste molecular (qPCR) otimizado durante o estudo, apresentou sensibilidade e especificidade de 100%. O ensaio com a endonuclease revelou que a maioria das amostras de soro humano tornou-se B19V DNA negativa após o pré-tratamento, indicando que não eram infecciosas. Foi observado prevalências do B19V DNA em 5,5% dos pacientes com DE; 6,6% em DFA; 65,6% em DRC, e 23,3% em FHA. Como conclusão a técnica de qPCR otimizada no presente estudo foi efetiva para o esclarecimento de casos da infecção por B19V e é adequada para diagnóstico diferencial. Além disso, o teste laboratorial baseado em endonuclease possibilitou a discriminação do B19V DNA (se encapsulado em vírions ou não). Portanto, estes testes podem ser utilizados para esclarecer o papel do B19V como agente etiológico associado a diversas manifestações clínicas. As prevalências encontradas nesse estudo indicam que o B19V está circulando entre os diversos grupos populacionais estudados e deve ser feita uma melhor vigilância da infecção, pois está presente tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunocomprometidos. Além disso, os resultados sugerem a importância da inclusão de B19V no diagnóstico laboratorial diferencial, não apenas para fins epidemiológicos, mas também para o manejo adequado do paciente.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **EVALUATION OF HUMAN PARVOVIRUS B19 INFECTION AMONG POPULATIONAL GROUPS: DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC AND IMMUNOPATHOGENICAL ASPECTS OF ACUTE AND PERSISTENT INFECTION**

#### **ABSTRACT**

#### **PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL**

**Arthur Daniel Rocha Alves**

Parvovirus B19 (B19V) infection can occur in immunocompetent and immunocompromised individuals of all group ages and is characterized as acute and self-limiting, which can lead to rash disease (RD), acute febrile illness (AFI), chronic kidney disease (CKD), and acute liver failure (ALF). Differential diagnosis of B19V in these populations often does not occur and studies on the prevalence of B19V are scarce, outdated, and do not reflect the current situation. B19V markers of acute infection can be detected in the circulation and in different tissue types, including non-erythroid tissues, for months to years and may lead to severe clinical manifestations, requiring hospital treatment, and to atypical inflammatory diseases, such as cardiomyopathy, rheumatoid arthritis, hepatitis, and vasculitis. However, the detection of B19V DNA does not necessarily imply the presence of infectious virions and the causal relation between B19V and atypical manifestations could not be proved yet. Thus, the aim of this study was to standardize the real-time PCR for quantification of B19V DNA and detection of infectious viral particles in order to perform the differential diagnosis of the B19V infection in RD, AFI, CKD, and ALF patients. For the diagnosis of the infection, samples from different populations were tested: RD (n=54), AFI (n=60), CKD (n=221), and ALF (n=30). Serum samples (and hepatic tissue for ALF) were submitted to the evaluation of B19V serological status (anti-B19V IgM and IgG antibodies) and molecular markers, in order to determine the stage of infection in which the patient is. For the evaluation of molecular markers, a quantitative real-time PCR methodology was optimized and allowed a sensitive and specific diagnosis of B19V DNA. In addition, the presence of virions in samples from patients with B19V (n=10) and from cynomolgus monkeys (n=4) experimentally infected were evaluated by endonuclease enzyme pretreatment. The molecular test optimized during the study showed 100% sensitivity and specificity. The endonuclease treatment assay revealed that most human serum samples became negative after pretreatment, as indicative of non-infective particles. Concerning the prevalence of B19V DNA: 5.5% were obtained in patients with RD; 6.6% in AFI; 65.6% in CKD, and 23.3% in ALF. In conclusion, the qPCR technique optimized in the present study was effective for clarifying cases of B19V infection and is suitable for differential diagnosis. In addition, the endonuclease-based laboratory test made it possible to discriminate B19V DNA (whether encapsidated in virions or not). Therefore, these tests can be used to clarify the role of B19V as an etiologic agent associated with several clinical manifestations. The prevalence found in this study indicate that B19V is circulating among the different populational groups that have been studied and better surveillance of the infection should be carried out, as it is present in both immunocompetent and immunocompromised individuals. In addition, the results suggest the importance of including B19V in the differential laboratory diagnosis, not only for epidemiological purposes but also for the proper management of the patient.



# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Histórico</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Taxonomia e estrutura viral</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Organização genômica e proteica</b> .....	<b>4</b>
1.3.1 Variabilidade genômica.....	6
<b>1.4 Ciclo de replicação</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 Imunopatogênese e transmissão</b> .....	<b>10</b>
1.5.1 Infecção aguda .....	11
1.5.2 Infecção persistente.....	13
<b>1.6 Manifestações clínicas</b> .....	<b>15</b>
1.6.1 Eritema infeccioso.....	15
1.6.2 Poliartropatia.....	16
1.6.3 Alterações hematológicas .....	17
1.6.4 Hidropisia fetal .....	18
1.6.5 Hepatite .....	19
1.6.6 Glomerulonefrite .....	20
1.6.7 Miocardite .....	22
<b>1.7 Tratamento e prevenção</b> .....	<b>23</b>
<b>1.8 Diagnóstico</b> .....	<b>24</b>
1.8.1 Diagnóstico sorológico .....	24
1.8.2 Diagnóstico molecular.....	25
<b>1.9 Epidemiologia</b> .....	<b>27</b>
<b>1.10 Justificativa</b> .....	<b>29</b>
<b>1.11 Hipótese</b> .....	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>33</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Otimização de teste diagnóstico por PCR em tempo real</b> .....	<b>34</b>

3.2	Avaliação de um método molecular para discriminação de DNA <i>naked</i> e associado a virion em amostras clínicas .....	44
3.3	Diagnóstico diferencial de parvovirus B19 em pacientes com falência hepática aguda .....	59
3.4	Diagnóstico laboratorial de parvovirus B19 em pacientes com doença renal crônica.....	71
3.5	Diagnóstico diferencial de Parvovirus B19 para doenças exantemáticas e febris agudas.....	79
4	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>116</b>
5	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>123</b>
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>124</b>
7	<b>PRODUÇÃO COMPLEMENTAR</b>	<b>143</b>
7.1	Betaherpesvirus e falência hepática aguda.....	143
7.2	Anticorpos equinos contra SARS-CoV-2.....	143
7.3	Deteção de SARS-CoV-2 em saliva .....	144
8	<b>ANEXOS</b>	<b>145</b>
8.1	Comitê de Ética em Pesquisa para os artigos 1, 2 e 3.....	145
8.2	Comitê de Ética em Pesquisa para os artigos 4 e 5.....	157
8.3	Comitê de Ética em Pesquisa para o artigo 5.....	166

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura1-1 Micrografia de transmissão para o Parvovirus B19.....</b>	<b>1</b>
<b>Figura1-2 Estrutura do genoma e mapa genético do B19V .....</b>	<b>4</b>
<b>Figura1-3 Esquema do ciclo de Replicação do Parvovirus B19 .....</b>	<b>8</b>
<b>Figura1-4 Curso da infecção do Parvovirus B19 .....</b>	<b>12</b>
<b>Figura1-5 Modelo de persistência do B19V em tecidos não eritroides.....</b>	<b>14</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela1-1 Doenças causadas pelo B19V .....</b>	<b>15</b>
---	-----------

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
AAVs	Vírus Adeno-associados
AFI	<i>Acute febrile illness</i>
ALF	<i>Acute Liver Failure</i>
ALT	Alanina transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
B19V	Parvovirus humano B19
BFU-E	Unidades formadoras de broto
BM	<i>Bone marrow</i>
BuV	Bufavírus
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Crise aplástica transitória
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	<i>Confident interval</i>
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>
CMV	Citomegalovírus
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	Cycle threshold
CuV	Cutavírus
CV	Coeficiente de variação
DE	Doenças exantemáticas
DFA	Doenças febris agudas
Dpi	<i>Days post-infection</i>
DRC	Doença renal crônica
dsRF	<i>Double-stranded replicative form</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
EI	Eritema infeccioso
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHA	Falência Hepática Aguda
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz

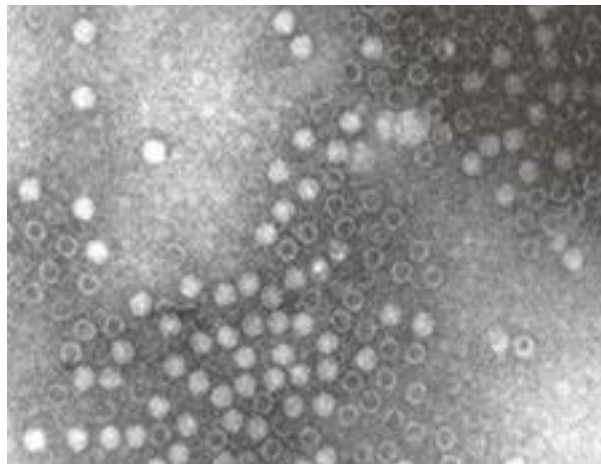
g/dL	Gramas por decilitro
HAAA	Hepatite associada a anemia aplástica
Hb	Hemoglobina
HBoV	Bocavirus humano
HBV	Vírus da Hepatite B
HE	<i>Hepatic encephalopathy</i>
Hemorio	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HFB	Hospital Federal de Bonsucesso
HGVF	Hospital Getúlio Vargas Filho
HHV-6	Herpesvírus humano 6
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
INR	<i>International ratio</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IQR	<i>Interquartile range</i>
ITRs	<i>Identical inverted terminal repeats</i>
kB	Kilobases
kDa	Kilodáltons
LADTV	Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
N	Número
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
°C	Graus Celsius
OR	<i>Odds-ratio</i>
PARV4	Parvovirus 4
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGMT	Programa de pós-graduação em Medicina Tropical
PrInt	Programa de Internacionalização
p-value	Valor de p
qPCR	PCR quantitativo e em tempo real

RD	<i>Rash diseases</i>
RJ	Rio de Janeiro
SD	<i>Standard deviation</i>
SPLV	<i>Serum parvovirus-like particle</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
T <sub>m</sub>	Temperatura de Melting
TTV	Vírus transmitido por transfusão
TuV	Tusavírus
UFF	Universidade Federal Fluminense
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
VP1-u	Região única de VP1
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

O Parvovírus Humano B19 (B19V) foi primeiramente caracterizado no ano de 1974 por Yvonne Cossart do Laboratório de Referência de Vírus de Colindale, Londres, Inglaterra, a partir da triagem rotineira de anticorpos contra a hepatite B em doadores de sangue saudáveis. As amostras destes indivíduos quando testados por contraímunoeletroforese, geravam uma linha de precipitação com soro polivalente humano contra o vírus da hepatite B (HBV), mas quando testados por radioimunoensaio eram negativos para o HBV <sup>1</sup>. A microscopia eletrônica das linhas de precipitação revelou a presença de partículas muito pequenas, de cerca de 23nm, semelhantes à de parvovírus animais (Figura 1-1).



**Figura1-1 Micrografia de transmissão para o Parvovírus B19**

Fonte: adaptado de Servant-Delmas e colaboradores <sup>2</sup>

Este vírus, até então desconhecido, foi denominado como SPLV devido ao nome em inglês *Serum parvovirus-like particle*, literalmente traduzido como “partícula semelhante a parvovírus no soro”. Curiosamente, devido ao fato do soro onde foi encontrado o parvovírus ocupar a posição 19 da placa B do ensaio, o vírus foi posteriormente denominado como Parvovírus B19. O vírus foi independentemente descrito na França em 1972 e recebeu o nome de antígeno Aurillac<sup>3</sup> e no Japão em 1980, chamado de vírus “Nakatani” <sup>4</sup>, porém foi demonstrado pela comunidade científica que esses vírus eram idênticos, sendo aceita até os dias de hoje a descrição mais antiga.



O B19V foi somente associado à uma doença humana inespecífica cinco anos depois de sua caracterização, através da análise de microscopia eletrônica de partículas virais, em amostra de soro de dois soldados com doença febril <sup>5</sup>. No ano seguinte o vírus foi associado à crise aplástica transitória, pois foram observados antígenos do B19V no soro de uma criança Jamaicana residente em Londres na fase aguda da crise aplástica e anticorpos na fase convalescente por contraímunoeletroforese <sup>6</sup>.

Outras doenças foram associadas ao B19V nos anos seguintes, como o eritema infeccioso durante o estudo de um surto em uma escola de Londres, e hoje em dia, este vírus é aceito como causador desta doença, popularmente conhecida como Quinta doença <sup>7</sup>. A hidropsia fetal decorrente da infecção intrauterina por B19V foi primeiramente relatada em 1984<sup>8</sup> e a artrite aguda no ano seguinte <sup>9</sup>.

A primeira evidência de B19V no Brasil ocorreu no Rio de Janeiro em 1983, quando Yoshida e Gaspar encontraram anticorpos em doadores de sangue por contraímunoeletroforese e em 1985 quando Nogueira detectou anticorpos por radioimunoensaio no soro de uma gestante com suspeita de rubéola. Entretanto, esses achados não foram publicados, somente mencionados por Cruz e colaboradores em 1989 <sup>10</sup>, quando publicaram a detecção do antígeno de B19V em amostra de plasma de doador de sangue assintomático na cidade de Cabo Frio em outubro de 1988. Estudo de prevalência de anticorpos da infecção pelo B19V foram conduzidos na cidade do Rio de Janeiro em 1985 e 1986 <sup>11</sup>.

A primeira descrição de eritema infeccioso no Brasil foi feita em Belém no ano de 1988 durante o estudo de 39 casos de doença exantemática, sendo 13 pacientes IgG positivos para B19V e dois pacientes IgM positivos<sup>12</sup>. Além disso, em uma escola na cidade de São Paulo em 1988, durante um surto de doença exantemática, partículas semelhantes a parvovírus foram observadas por microscopia eletrônica na urina e secreção nasofaríngea das crianças<sup>13</sup>.

Em 1992 ocorreu o primeiro relato de crise aplástica transitória associada ao B19V em pacientes com anemias constitucionais <sup>14</sup>. Em 1996 detectou-se pela primeira vez o genoma do B19V em dois casos de hidropsia fetal não imune que ocorreram no ano de 1988, coincidindo com a detecção do B19V no plasma de doadores de sangue, sugerindo que 1988 foi um ano epidêmico para o B19V no Rio de Janeiro <sup>15</sup>.

## 1.2 Taxonomia e estrutura viral

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), o Parvovírus Humano B19 é o nome do vírus que pertence ao domínio *Monodnaviria*, reino *Shotokuvirae*, filo *Cossaviricota*, classe *Quintoviricetes*, ordem *Piccovirales*, família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Erythroparvovirus*, e a espécie *Primate Erythroparvovirus 1* <sup>16</sup>.

Todos os vírus alocados na família *Parvoviridae*, que abrange 126 espécies, são caracterizados por: terem um tamanho extremamente diminuto (parvo, vem do latim e significa pequeno), de cerca de 18 a 28nm de diâmetro, estando entre os menores vírus de genoma DNA conhecidos; terem um genoma de DNA fita simples, de cerca de 3,9 a 6,3kB; e pela região codificante do genoma ser fechada por repetições terminais em grampo<sup>17,18</sup>.

Os primeiros parvovírus humanos foram descobertos por acaso, como os Vírus Adeno-associados (AAVs), em 1965, através da visualização em microscopia eletrônica de um agente contaminante de cultura de células de adenovírus, hoje em dia é utilizado como vetor viral em terapia gênica, e o B19V, 10 anos após, que foi considerado o único membro da família *Parvoviridae* patogênico para humanos<sup>19</sup>.

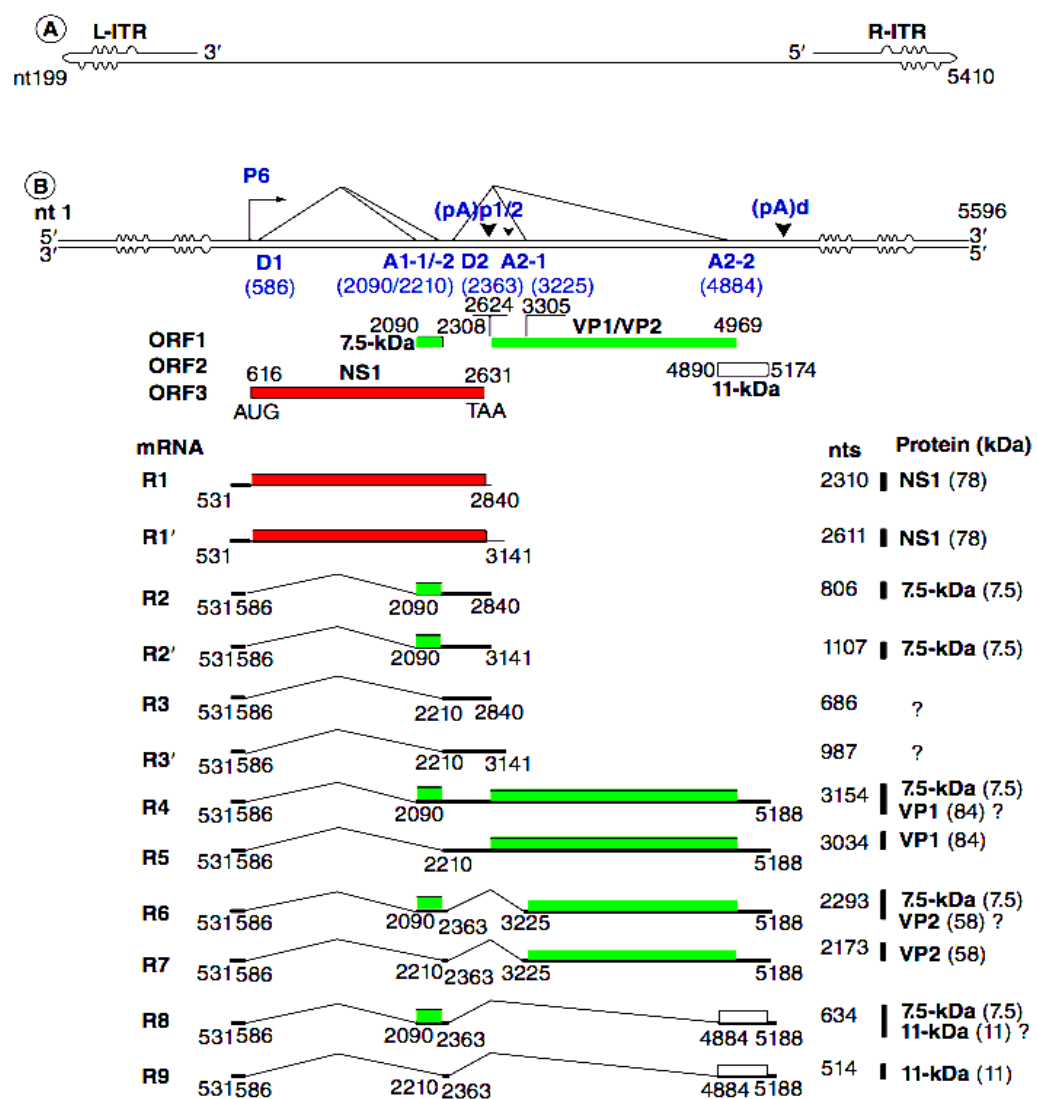
Demoraram cerca de 30 anos para que novos parvovírus emergissem, com as descobertas em 2005, do Bocavirus humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias, e atualmente já se mostrou também como associado a infecções gastrointestinais<sup>20</sup>e o Parvovírus 4 (PARV4) detectado em um paciente usuário de droga e infectado pelo vírus da hepatite B <sup>21,22</sup>. Com o advento de tecnologias de sequenciamento massivo paralelo (NGS) três protoparvovírus foram descobertos nas fezes de crianças com diarreia: Bufavírus (BuV em 2012) <sup>23</sup>; Tusavírus (TuV em 2014) <sup>24</sup>; e Cutavírus (CuV em 2016) <sup>25</sup>.

O virion do B19V mede entre 23 e 28nm de diâmetro e possui entre 5,5 e  $6,2 \times 10^6$  kDa de peso molecular. É destituído de envelope e o capsídeo possui simetria icosaédrica (T=1), formado por 20 faces triangulares (60 capsômeros), composto de 5-10% de proteína VP1 e 90-95% de proteína VP2 <sup>26</sup>. Devido à ausência de envelope, o vírion é resistente a diversos processos esterilizantes, como: inativação por temperatura de 56°C por 60 minutos, e quando submetida a solventes orgânicos, agentes oxidantes, formalina e irradiação por raios gama; Além disso se mantêm-se estável em pH variando entre 3 e 9, à <sup>20,27-29</sup>.

### 1.3 Organização genômica e proteica

O genoma do B19V é constituído por um filamento único de DNA linear de fita simples (ssDNA), e, diferentemente, de outros parvovírus que encapsidam somente o genoma de polaridade negativa, o B19V apresenta 50% das partículas virais com genoma de polaridade positiva e 50% negativa <sup>30</sup>.

Este ssDNA possui 5596 nucleotídeos e é flanqueado por duas repetições terminais inversamente idênticas (ITRs) de 365 nucleotídeos que formam um palíndromo imperfeito em formato de grampo em cada extremidade do genoma, que funcionam como uma origem de replicação do genoma (Figura 1-2A) <sup>31</sup>.



**Figura 1-2 Estrutura do genoma e mapa genético do B19V**

Figura A: esquema da estrutura do genoma do B19V com as ITRs e a figura B: diagrama esquemático da forma replicativa do genoma do B19V e os RNAs transcritos com as respectivas proteínas.

Fonte: Luo & Qiu<sup>31</sup>.

Após a entrada do vírus no núcleo da célula, o ssDNA é convertido em uma forma replicante dupla fita (dsRF), que permite a replicação do genoma e a sua transcrição<sup>26</sup>. Essa forma dsRF apresenta um único promotor (P6) que expressa um único RNA mensageiro precursor. O promotor P6 é transativado pela proteína viral NS1 ou outros fatores de transcrição (como: CREBP, GATA, entre outros). O RNA mensageiro precursor sofre *splicing* alternativo e poliadenilação para expressar pelo menos 12 transcritos de RNA mensageiros maduros que codificam duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) e três não estruturais (NS1, 7,5 e 11 kDa)<sup>32,33</sup>.

O RNA mensageiro precursor contém dois locais doadores de splice (D1 e D2) e quatro locais aceitadores de splice (A1-1, A1-2, A2-1 e A2-2). Além disso, ele também abriga dois locais de poliadenilação proximais [(pA)p]1/2 e um distal (pA)d. Os transcritos de RNA que não sofrem *splicing* e que poliadenilam em (pA)p (R1 e R1') codificam a proteína NS1; enquanto aqueles que sofrem *splicing* em A1-1 e usam sítios (pA)p (R2 e R2') codificam a proteína de 7,5 kDa. Os transcritos de RNA poliadenilados em (pA)d e onde o 1º íntron (R4 e R5), 1º e 2º íntrons (R6 e R7) e 1º, 2º e 3º íntrons (R8 e R9) são processados, codificam para as proteínas VP1, VP2, e de 11 kDa, respectivamente. É desconhecido se os transcritos de RNA (R3 e R3') codificam alguma proteína ou desempenham algum papel durante a infecção pelo B19V (Figura 1-2B)<sup>34-36</sup>.

Entre as proteínas virais não estruturais, a proteína NS1 possui 78kDa e 671 aminoácidos (dos nucleotídeos 436 ao 2451). É localizada no interior do núcleo de células infectadas e apresenta fundamental importância para a replicação do genoma viral, por conter domínios de atividade nuclease, helicase e um domínio transativador<sup>37</sup>. Além disso, essa proteína é necessária para a resposta ao dano no DNA, para a apoptose, para o arraste do ciclo celular e para a produção da progênie viral<sup>38</sup>.

Além de NS1, existem outras proteínas não estruturais menores, como: 11kDa (dos nucleotídeos 4890 ao 5174) que participa da sinalização celular e 7.5kDa (dos nucleotídeos 2090 ao 2308) que ainda não possui uma função detalhada<sup>31</sup>.

O capsídeo do B19V é composto por duas proteínas estruturais: VP1 e VP2 codificadas por fases de leitura aberta sobrepostas<sup>34,35</sup>. Cada capsídeo formado é composto por uma estrutura icosaédrica com 60 capsômeros. A proteína VP2 é a mais abundante, pois compõe cerca de 96% da estrutura do capsídeo, por isso é alvo do sistema imune para a resposta humoral. Sua sequência é codificada entre os

nucleotídeos 3225 a 4789, formando uma proteína de 654 aminoácidos e peso molecular de 58kDa. A proteína do capsídeo menos abundante, a VP1, é codificada entre os nucleotídeos 2444 a 4789, formando uma proteína de 992 aminoácidos, peso molecular de 84kDa e contém epítomos de neutralização para o sistema imune<sup>31,34,35</sup>. Parte da proteína VP1 e da proteína VP2 são codificadas por uma mesma região, porém a proteína VP1 apresenta uma região única na porção 3' (amino terminal), de 227 aminoácidos, chamada de região única de VP1 (VP1-u). Essa região é importante, por induzir uma resposta imune, por ser alvo de respostas celulares CD4+/CD8+, por ter uma atividade de fosfolipase A2 que auxilia no transporte da partícula viral na célula infectada<sup>39-41</sup>.

As proteínas VP1 e VP2 podem ser expressas em cultura de células bacterianas, de insetos e de mamíferos e são organizadas sem a presença de um DNA viral, formando um capsídeo vazio, também conhecido como VLP (*virus like-particle*), que são morfológica, antígenica e imunologicamente similares a virions<sup>42-44</sup>.

### 1.3.1 Variabilidade genômica

O genoma viral do B19V apresenta pouca variabilidade genética, sendo altamente conservado, com cerca de 98% de similaridade entre os isolados<sup>45,46</sup>. Porém na França, em 1998 foi identificado, a partir de um soro de uma criança com crise aplástica transitória, um isolado cuja sequência apresentava 11% de diferença na região VP1-u quando comparadas às sequências de outros isolados de B19V<sup>47</sup>. Essa variante, denominada V9, foi clonada e o seu genoma foi inteiramente sequenciado, mostrando que não somente a região VP1-u era diferente. Este achado levou à hipótese de que outras variantes de B19V estariam presentes na população humana.

Em 2002, a variante A6 foi detectada em uma amostra coletada em 1991 de um paciente italiano infectado pelo HIV com anemia crônica, cuja sequência apresentou 87,8% de semelhança com o B19 e 92% em relação ao V9<sup>48</sup>. Outras variantes do B19V chamadas, LaLi e HaAm, foram encontradas em amostras de pele, mostrando pela primeira vez uma relação entre um genótipo e o tropismo por um tecido específico<sup>49</sup>. Também em 2002, Servant e colaboradores relataram a presença em uma amostra de um paciente francês, do genoma do B19V que se alinhou com o V9 mas com 5,3% de divergência, denominada D91.1<sup>50</sup>.

A identificação dessas variantes e análises filogenéticas desses múltiplos isolados levaram à classificação do B19V em três genótipos distintos: o genótipo 1, que apresenta como cepa protótipo Au e pode ser dividido em dois subgenótipos (1a e 1b) <sup>51,52</sup>; o genótipo 2 que possui as cepas protótipos LaLi<sup>49</sup> e A6 <sup>48</sup>; e o genótipo 3 que apresenta as cepas protótipos V9 e D91.1, e que posteriormente foi subdividido em dois subgenótipos, 3a e 3b respectivamente <sup>53,54</sup>. Esses 3 genótipos são distintos com mais de 9% de divergência nucleotídica em todo o genoma entre as sequências avaliadas <sup>50</sup>.

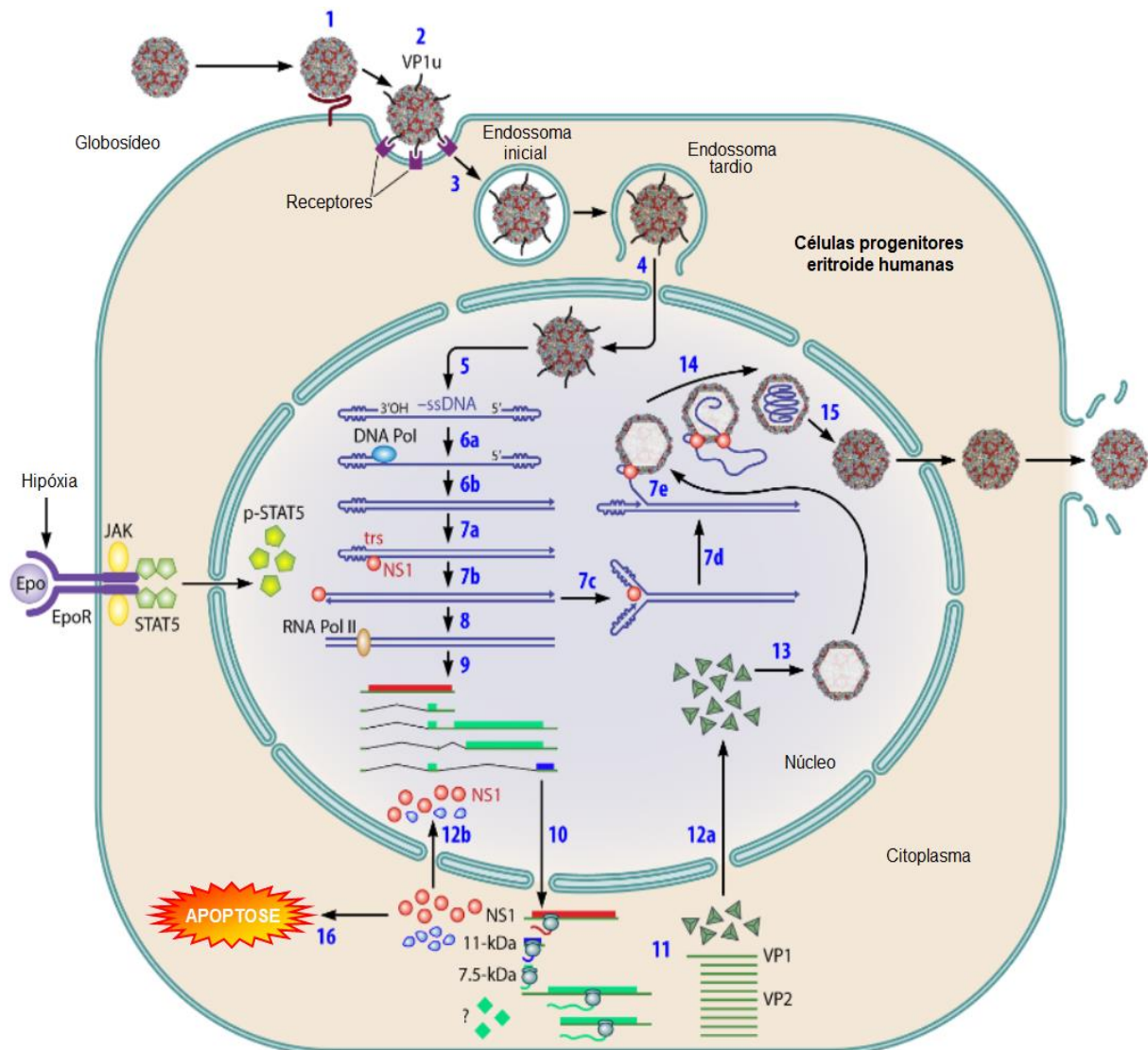
A distribuição de cada genótipo depende da origem geográfica, da população e do tipo de amostra avaliado. Em relação à origem geográfica o genótipo 1 é o prevalente em todo o mundo, o genótipo 3 parecia mais restrito à África, porém já foi detectado em outros países inclusive no Brasil e o genótipo 2 era detectado em pacientes maiores de 50 anos (ou seja nascidos até 1973); depois esse genótipo não foi mais encontrado até recentemente, quando foi detectado em um doador de sangue na Alemanha <sup>55,56</sup>. Em amostras de tecido a prevalência para o genótipo 1 fica entre 28% e 81% <sup>57,58</sup>; para o genótipo 2, entre 8% e 71% <sup>55,57</sup> e para o genótipo 3, entre 0% e 50% <sup>56,57</sup>. Existe uma predominância mundial do genótipo 1 e está sendo sugerido uma propagação desde 2009 do genótipo 3b em todo o mundo <sup>59</sup>.

No Brasil os três genótipos já foram detectados e existe a predominância do genótipo 1, como em outros países<sup>55,60-62</sup>. Até o momento, o genótipo 2 foi detectado apenas em São Paulo em 2004, em amostras de medula óssea de um paciente com idade superior a 51 anos que apresentava citopenia de origem desconhecida e neoplasias hematológicas <sup>55</sup>. O genótipo 3b foi detectado em diversos estudos: em soro de pacientes com exantema, artropatias e desordens hematológicas em Belém <sup>60</sup>; em uma paciente com anemia aguda após a ocorrência de um transplante renal <sup>61</sup> e em uma paciente infectada pelo HIV durante uma epidemia de eritema infeccioso em Niterói <sup>63</sup>. Coinfecção entre os genótipos 1a e 3b foi descrita em amostras de medula óssea de pacientes com leucemia <sup>64</sup>.

#### 1.4 Ciclo de replicação

A adsorção, que inicia o processo de replicação, depende da ligação entre a sua proteína estrutural VP2 ao antígeno P (globo-tetraosil-ceramida, GalNac( $\beta$ 1-3), Gal( $\alpha$ 1-4), Gal( $\beta$ 1-4)GlcCer) de células progenitoras eritroides humanas (etapa 1 da Figura 1-3). Esse antígeno P também está presente em outras células, como:

megacariócitos, células endoteliais, placentárias, miocárdicas, fetais e hepáticas, sugerindo que essas células também são susceptíveis ao B19V <sup>65</sup>, podendo ser responsável por sua disseminação sistêmica <sup>66</sup>.



**Figura1-3 Esquema do ciclo de Replicação do Parvovirus B19**

Fonte: adaptado de Qiu e colaboradores <sup>36</sup>

Essa ligação entre VP2 e antígeno P expõe sítios conformacionais da região única N-terminal da proteína VP1, conhecida como VP1-u (etapa 2). Algumas evidências mostram que este antígeno funciona somente para a exposição de VP1-u <sup>67</sup>, e que outro co-receptor, ainda desconhecido, estaria implicado na entrada do vírus na célula-alvo. Um complexo de integrina  $\alpha 5\beta 1$  tem sido implicado como um co-receptor para a entrada do vírus nas células <sup>37</sup>.

Como ocorre com outros parvovírus, o B19V entra na célula por meio da via endocítica (etapa 3), uma vez que vesículas foram observadas através de microscopia eletrônica. O domínio de fosfolipase A2, presente na região VP1-u do B19V é exposto devido à diminuição de pH que ocorre dentro dos lisossomos<sup>68</sup> (etapa 4). Esse domínio também é responsável por indicar o sinal de localização nuclear e uma rede de microtúbulos é modulada, por  $\beta 1$ , do complexo co-receptor de integrina  $\alpha 5\beta 1$  presente nas vesículas endocíticas, e permite o tráfego dessas vesículas com as partículas virais pelo citosol até o núcleo da célula, onde a partícula viral será desfeita<sup>69</sup> (etapa 5).

Após a adsorção, o tráfego pelo citosol, a entrada no núcleo e o desnudamento do capsídeo, o material genético se encontra exposto, a partir desse momento pode ser mencionado que existe o DNA *naked* do B19V, que necessita que a célula esteja em fase S da mitose (duplicação do DNA) para que a replicação viral possa ocorrer<sup>29</sup>.

As estruturas palindrômicas ITRs de 365 nucleotídeos, nesse momento de fase S, funcionam como iniciadores (*primers*) para a DNA polimerase celular (etapa 6a). A replicação começa nessas regiões que são de DNA dupla fita e ocorre através da formação de uma fita complementar (etapa 6b). Intermediários de fita dupla são formados com a continuação da replicação, que posteriormente são enzimaticamente clivados gerando o DNA de fita simples<sup>70,71</sup> (etapas 7 e 8).

O processo de transcrição inicia-se no promotor P6 e a partir desse promotor são transcritos nove RNAm (figura 1-2). Esses transcritos codificam para a proteína não estrutural NS1, para as proteínas estruturais VP1 e VP2 e para as proteínas menores não estruturais de 11kDa e 7,5kDa<sup>31</sup> (etapa 9). O único RNAm que não sofre processamento pós-transcricional (*splicing*) traduz a proteína NS1, enquanto que todas as demais proteínas, tem os seus RNAm processados, inclusive, as proteínas estruturais, VP1 e VP2, dependem desse processamento, uma vez que suas fases de leitura aberta são sobrepostas<sup>32</sup>.

Nesse momento, a proteína NS1 atua como um forte ativador de transcrição por recrutar numerosos fatores de transcrição celular e também participa da replicação através das suas propriedades de helicase e endonuclease<sup>72</sup>. Um bloqueio da produção de transcritos no sítio de poliadenilação é associado a uma limitada permissividade das células à infecção do B19V<sup>73</sup>.

Os RNAm processados são transportados ao citosol, onde ocorre a tradução das proteínas virais estruturais e não estruturais (etapa 10). Após a tradução, as



proteínas são direcionadas para o núcleo (etapa 11) para a montagem das novas partículas virais (etapas 12, 13 e 14) e em seguida ocorre a liberação viral dependente de lise celular <sup>74</sup> (etapa 15).

O B19V não pode ser propagado em cultura de células convencionais, mas alguns estudos *in vitro* em culturas humanas de medula óssea explantadas demonstraram que o B19V é capaz de inibir a formação de colônias de células progenitoras eritroides (BFU-E, ou unidades formadoras de broto) <sup>35</sup> e de precursores mielóides<sup>75</sup>. A susceptibilidade dos progenitores eritroides à infecção por B19V aumenta com a diferenciação <sup>76</sup>. O B19V pode ser cultivado em células progenitoras eritroides de explantes de medula óssea humana, fígado fetal, sangue umbilical e sangue periférico. Em todos os sistemas de cultura, a eritropoietina é necessária para manter a replicação viral, provavelmente auxiliando na divisão rápida de progenitores eritroides. Todos os sistemas são apenas de explantes de cultura e não são adequados para cultura a longo prazo<sup>27</sup>.

No entanto, o B19V também pode ser propagado em algumas linhagens celulares especializadas: duas linhagens celulares de megacarioblastos (MB-02 e UT-7/Epo) e duas linhagens celulares de leucemia eritroide humana (JK-1 e KU812Ep6)<sup>76-79</sup>. Estas linhagens celulares têm sido utilizadas para estudar mecanismos de replicação e desenvolver ensaios de neutralização e de infecciosidade <sup>79,80</sup>. No entanto, o rendimento de vírus de todas estas culturas é baixo e não podem ser utilizadas como fontes de antígenos para testes de diagnóstico.

O efeito citopático da infecção de células progenitoras eritroides infectadas com B19V, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, manifesta-se como pronormoblastos gigantes (conhecidos como células de lanterna ou como células do tipo *Pop corn*), são células eritroides precoces com um diâmetro de 25 a 32 $\mu$ m, grandes corpos de inclusão nucleares eosinofílicos e vacuolização citoplasmática e, ocasionalmente, podem ser observadas projeções <sup>81,82</sup>. Algumas micrografias revelam alterações ultra-estruturais citopáticas que incluem formação de pseudópodes, cromatina marginada e partículas virais no núcleo <sup>83</sup>.

## 1.5 Imunopatogênese e transmissão

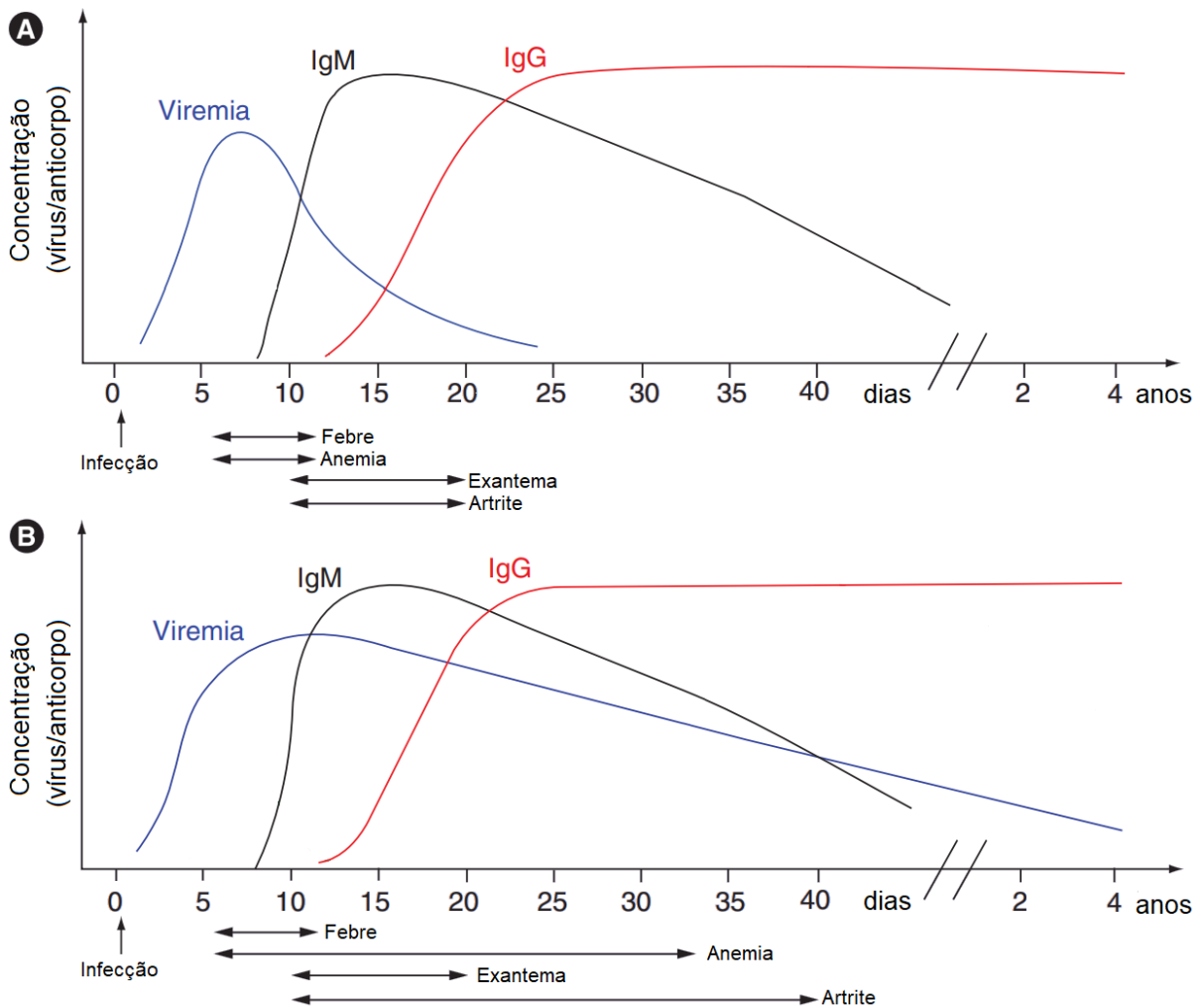
A patogênese da infecção pelo B19V começou a ser estudada em 1985, quando Anderson e colaboradores demonstraram que o período de incubação viral varia de 4 a 14 dias e a viremia ocorre de 6 a 8 dias após a exposição, persistindo por

6 a 7 dias, a partir de técnicas de hibridização *in situ*. Durante a fase aguda da doença (período de viremia), o vírus está presente no sangue, saliva e secreção da nasofaringe, facilitando a disseminação viral <sup>84,85</sup>.

A transmissão por via respiratória, através da inalação de aerossóis contaminados, é a mais eficaz na propagação do B19V principalmente durante a infância <sup>86,87</sup>. O vírus também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas <sup>88</sup> e por transplante de órgãos como: rim, coração e fígado de doadores infectados <sup>89</sup>. Além disso, devido ao tropismo do vírus por células sanguíneas mitoticamente ativas, pode ocasionar em gestantes a passagem do vírus através do cordão umbilical, comprometendo o tecido fetal <sup>90</sup>.

### **1.5.1 Infecção aguda**

A patofisiologia da infecção aguda pelo B19V é iniciada com 7 dias do estabelecimento da infecção, quando ocorre um pico de carga viral no sangue (viremia de  $10^{11}$ - $10^{14}$  unidades internacionais por mL), e com o início da queda da carga viral ocorre o aparecimento de anticorpos da classe IgM específicos anti-B19V que permanecem detectáveis até 4 meses após a infecção. Os anticorpos IgG anti-B19V surgem com 14 dias após a infecção e permanece no soro por tempo indeterminado (Figura 1-4)<sup>27</sup>.



#### Figura1-4 Curso da infecção do Parvovírus B19

Figura A: caso de infecção aguda pelo B19V. Figura B: infecção persistente

Fonte: adaptado de Plentz & Modrow<sup>91</sup>

Com a viremia, outros eventos são detectados, como a redução abrupta de reticulócitos, de 0,8% a 0,2% em alguns indivíduos. Os níveis de hemoglobina apresentam reduções, porém pouco perceptíveis em indivíduos saudáveis (em torno de 14g/dL), mas muito abrupta em pacientes com crise aplástica transitória (variação de 8g/dL para 4g/dL) e irreversível em pacientes com anemia severa, em muitos casos sendo necessária a administração de hemocomponentes<sup>92</sup>.

A maioria dos indivíduos não apresenta manifestações típicas da infecção pelo B19V. Os sintomas inespecíficos como febre, calafrios, cefaléia e mialgia são observados após a viremia inicial e em um segundo momento, ocorrem sintomas mais específicos da infecção como eritema e artralgia. Em pacientes com crise aplástica transitória e anemia, os sintomas de anemia ocorrem por períodos mais prolongados de tempo. Dessa forma, é sabido que a infecção aguda pelo B19V é agravada em pacientes com problemas imunológicos e hematológicos<sup>92</sup>.

### **1.5.2 Infecção persistente**

Uma característica na patofisiologia da infecção pelo B19V que vem recebendo destaque na comunidade científica é a capacidade do DNA viral persistir no sangue e em tecidos específicos de indivíduos imunocompetentes mesmo depois da resolução da infecção aguda<sup>37</sup>. Os tecidos que podem ser acometidos por essa persistência do B19V DNA são: amígdalas, cérebro, colo do útero, coração, fígado, linfonodos, medula óssea, pele, pulmão, rim, tecido sinovial, testículos e tireóide<sup>93</sup>.

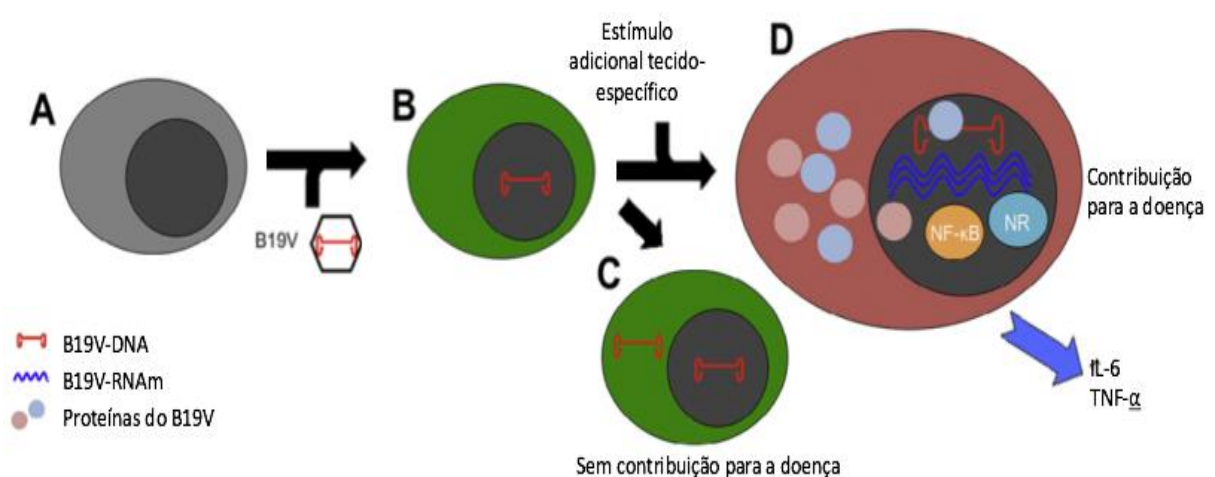
A persistência do B19V é definida pela detecção do DNA no sangue por mais de 16 semanas. A primeira descrição que evidenciou a persistência do vírus foi em 1993, em um caso de meningite associada ao B19V em que o DNA foi detectado até 9 meses após a infecção<sup>94</sup>. Geralmente, a carga viral de indivíduos imunocompetentes que desenvolvem infecção persistente, é baixa e somente pode ser detectada por PCR em tempo real quantitativo (qPCR) devido à alta sensibilidade da técnica<sup>95</sup>.

A detecção de B19VDNA em tecidos deve ser combinada com a detecção de anticorpos específicos anti-B19V no soro para estabelecer se a carga viral detectada está associada a uma infecção persistente ou a uma infecção aguda, portanto se um paciente apresenta carga viral menor que  $10^4$  cópias/mL, IgM não reativo e IgG reativo, considera-se uma infecção persistente, enquanto que se um paciente apresenta carga viral maior ou igual a  $10^4$  cópias/mL, IgM e IgG reativo, a infecção é considerada aguda<sup>93</sup>. Geralmente, a quantidade média de amostras positivas para o B19VDNA em tecidos é de 44,8%, estando de acordo com relatos de que cerca da metade da população jovem já foi infectada pelo B19V<sup>92</sup>. Quando são realizados ensaios de PCR para as sequências que codificam as proteínas do capsídeo (VP1 e VP2) e para a sequência que codifica a proteína não estrutural (NS1), foram relatadas disparidades na detecção das duas regiões. Por exemplo, nos tecidos testiculares e da pele, as sequências VP1-VP2 foram detectadas a uma frequência mais elevada em comparação com a NS1; em contraste, nenhuma diferença foi relatada em amostras de tecido sinovial. Detectando unicamente o B19VDNA, não é possível mostrar a persistência e qualquer associação com doenças em medula óssea, cérebro e tireóide. Em contrapartida, estudos que examinaram amostras de tecido cardíaco, hepático, sinovial e testicular possuem resultados que mostram a ligação entre a persistência do B19VDNA e o desenvolvimento de doença específica desses órgãos

<sup>56</sup>.

Ainda não existe uma explicação para a ocorrência da infecção persistente do B19V no sangue e em alguns tecidos, mas alguns autores acreditam que o B19VDNA se integre ao genoma da célula hospedeira, o que poderia levar a essa detecção persistente do genoma do B19V, porém esse fato, até o presente momento, não pode ser confirmado <sup>96-98</sup>. Outras hipóteses que estão sendo estudadas são: i) o silenciamento da expressão do B19V DNA por metilação das ilhas CpG<sup>99</sup>; ii) o aumento da expressão de fatores de transcrição e citocinas como NF- $\kappa$ B, Cox2 e IL-6 correlacionado com a expressão de proteínas VP1-VP2 de B19V em tecidos tireóides, linfóides e de colo <sup>100-103</sup>; iii) a expressão de NS1 em linhagens celulares HepG2 de hepatócitos que induzem apoptose envolvendo a ativação das caspases 3 e 9 <sup>104,105</sup>.

Um modelo das associações potenciais entre a infecção por B19V e o desenvolvimento de doença em tecidos não eritroides está ilustrado na Figura 1-5. Neste modelo, as células normais foram infectadas com B19V (A e B). A incapacidade de replicar em células não permissivas pode levar à persistência de um nível baixo de B19V DNA. Nas células sem expressão detectável de genes virais, a persistência do DNA pode resultar em nenhum efeito (C). Alterações na expressão de certos fatores celulares podem contribuir para a expressão de B19V em microambientes celulares específicos e indução de uma resposta inflamatória relacionada ao vírus (D) É desconhecido se o B19V é expresso continuamente nestas células a um nível baixo ou se é reativado. Ainda não foi demonstrado se o B19V pode realmente reativar <sup>93,106</sup>.



**Figura1-5 Modelo de persistência do B19V em tecidos não eritroides**

Fonte: adaptado de Adamson-Small e colaboradores <sup>93</sup>

## 1.6 Manifestações clínicas

O espectro de doenças relacionadas ao B19V primeiramente envolve as condições do sistema imunológico e hematológico do hospedeiro, podendo acarretar diferentes manifestações clínicas (Tabela 1-1) <sup>27</sup>. Em indivíduos saudáveis, a infecção pelo B19V geralmente é assintomática ou com sintomas inespecíficos e pode ocorrer tanto em crianças quanto em adultos <sup>86</sup>.

**Tabela 1-1 Doenças causadas pelo B19V**

DOENÇA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE PACIENTES
<b>Eritema infeccioso</b>	Aguda	Crianças saudáveis
<b>Poliartropatia</b>	Aguda	Adultos saudáveis
<b>Crise aplástica transitória</b>	Aguda	Pacientes com distúrbios hemolíticos
<b>Anemia persistente</b>	Crônica	Pacientes imunocomprometidos
<b>Hidropsia fetal</b>	Aguda/crônica	Fetos (<20 semanas)

Fonte: Adaptado de Young & Brown<sup>92</sup>

Outras doenças podem ser associadas à infecção pelo B19V, entretanto por serem incomuns, com alguns relatos de caso na literatura, e ainda não terem sido estabelecidos mecanismos definidos sobre a causa, são conhecidas como doenças atípicas do B19V, dentre as quais podem ser destacadas: miocardite <sup>107</sup>, vasculite necrotizante <sup>108</sup>, doença de Kawasaki <sup>109</sup>, púrpura de Henoch-Schönlein, ou púrpura reumática <sup>110</sup>, arterite de células gigantes <sup>111</sup>, síndrome de luvas e meias <sup>112</sup>, síndrome da fadiga crônica <sup>113</sup>, meningite, encefalite, oftalmite<sup>114</sup> e hepatite <sup>115</sup>.

### 1.6.1 Eritema infeccioso

O eritema infeccioso (EI) é a manifestação clínica mais comum em crianças <sup>116</sup> e é caracterizado por um eritema facial de intensidade média envolvendo as bochechas, com uma aparência eritematosas, edematosas e confluentes, comumente referidas como “bochecha esbofetada”, começando 18 dias após a infecção. Diversos agentes infecciosos podem causar doenças exantemáticas em crianças, sendo a principal razão de ida aos pediatras, durante a primeira infância. Em uma

tentativa de organização dessas doenças exantemáticas, o EI foi colocado como a quinta doença, por ser a quinta doença descrita na literatura. Por isso, mesmo com algumas diferenças entre os tipos de exantemas infecciosos, é muito difícil a realização do diagnóstico etiológico específico somente mediante o exame clínico<sup>98,117,118</sup>.

Importante ressaltar que a erupção do EI, que se acredita surgir da deposição de imunocomplexos nos vasos sanguíneos, geralmente é um indicador de que o paciente está eliminando adequadamente a infecção e não é mais contagioso<sup>116,119</sup>.

Os sintomas prodrômicos muitas vezes passam despercebidos, e, quando ocorrem, são sintomas inespecíficos que podem incluir febre, coriza, dor de cabeça e náuseas. Uma segunda fase consiste de uma erupção cutânea eritematosa rendilhada envolvendo o tronco e os membros, que pode ser bastante pruriginosa, e ocorre 1 a 4 dias após o eritema inicial. A erupção cutânea normalmente desaparece dentro de cerca de 1 semana, mas pode ser transitória ou recorrente, e ocorrer semanas a meses depois da ocorrência de alguns fatores ambientais, como: exposição à luz solar, temperatura quente e exercícios<sup>86,120</sup>. Outros sintomas também associados ao EI podem incluir prurido, vesículas e dermatite escamosa<sup>27</sup>.

### **1.6.2 Poliartropatia**

A presença de poliartropatia em crianças ocorre somente em 10% dos casos. Embora as articulações interfalângicas proximais e metacarpofalângicas sejam mais comumente afetadas em adultos, as crianças apresentam mais comumente o envolvimento de grandes articulações, particularmente os joelhos<sup>121</sup>. Acredita-se que isso esteja relacionado ao sistema imunológico, com a deposição de imunocomplexos. Entretanto, as crianças com artralguas não são ativamente contagiosas e esses sintomas geralmente desaparecem em 3 semanas<sup>119</sup>.

Em contrapartida, a poliartropatia é a manifestação mais comum da infecção primária por B19V em adultos, afetando 60% das mulheres e 30% dos homens<sup>86,122</sup>. A poliartropatia é mediada imunologicamente, uma vez que o aparecimento dos sintomas coincide com o surgimento de anticorpos circulantes. Os sintomas articulares aparecem como poliartrite periférica aguda, moderadamente grave, envolvendo as articulações metacarpofalângicas (75%), joelhos (65%), pulsos (55%) e tornozelos (40%), sem erosão articular<sup>123</sup>. Durante o seguimento a longo prazo da doença, nenhum paciente com poliartropatia associada a B19V relatou persistência de inchaço articular ou movimento restrito e nenhuma evidência de doença articular

inflamatória foi encontrada, mesmo com a presença de B19VDNA no líquido sinovial. Não há evidência para uma cronificação da poliartropatia causada pelo B19V <sup>124-126</sup>.

### **1.6.3 Alterações hematológicas**

A crise aplástica transitória (CAT) foi a primeira doença associada à infecção pelo B19V, refere-se a um breve episódio autolimitado de aplasia de eritrócitos e foi originalmente descrita em pacientes com anemia hemolítica <sup>6</sup>. Indivíduos infectados por B19V que sofram de diminuição na produção de eritrócitos ou maior destruição/perda destes estará em risco de desenvolver uma crise aplástica. A parada na produção de eritrócitos ocorre durante 10 a 15 dias, como observado durante a infecção em indivíduos saudáveis, e resulta em uma queda acentuada dos níveis de hemoglobina em doentes hemolíticos, devido à diminuição subjacente na sobrevivência de eritrócitos nesses doentes. Deficiência de ferro, anemia diseritropoiética congênita e talassemias são condições associadas à diminuição da produção de eritrócitos que tornam os pacientes susceptíveis à crise aplástica induzida pelo B19V <sup>92</sup>. Embora os eritrócitos sejam predominantemente afetados, outras alterações hematológicas podem ser observadas concomitantemente, tais como a trombocitopenia, neutropenia ou pancitopenia <sup>127-129</sup>. A crise aplástica tem os seus sintomas reduzidos com o aparecimento de anticorpos específicos e, portanto, raramente dura mais de 2 semanas. A incidência anual é de 1 a 5%, dependendo se ocorre ou não em epidemias de EI, predominando em crianças e representando um evento único na vida <sup>130,131</sup>. A crise aplástica geralmente se apresenta com palidez, fraqueza e letargia, e os pacientes são altamente virêmicos, representando um risco de transmissão para outros <sup>132</sup>.

Em pacientes imunocomprometidos, com uma capacidade reduzida de produzir uma resposta de anticorpos neutralizantes e devido a uma insuficiência persistente da medula óssea em produzir precursores eritroides, a infecção por B19V pode causar anemia persistente. As condições predisponentes para esse imunocomprometimento incluem: a síndrome de Nezelof<sup>133</sup>, leucemia <sup>134-137</sup>, síndrome mielodisplásica <sup>138</sup>, linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico<sup>139</sup>, astrocitoma, Tumor de Wilms, infecção por HIV, principalmente se os pacientes não estiverem fazendo uso de terapia antirretroviral<sup>140-142</sup>, transplante de medula óssea<sup>136,137,143</sup>, transplante de órgãos <sup>144,145</sup> e tratamento quimioterápico contra o câncer <sup>139</sup>. Os pacientes apresentam baixos níveis (ou ausência) de anticorpos específicos, sendo detectada a viremia persistente<sup>133</sup>. As características clínicas incluem fadiga e palidez, enquanto que os



sintomas mediados pela imunidade (EI e artralgia) geralmente não estão presentes  
133.

#### **1.6.4 Hidropisia fetal**

A infecção pelo B19V durante a gestação é um grave problema de saúde pública, pois no primeiro trimestre de gestação pode ocorrer o aborto, ainda sem um motivo aparente, porém é sugerido um dano sistêmico nos órgãos fetais, mesmo sem anemia e hidropisia <sup>146</sup>. Além disso, no segundo trimestre o feto pode desenvolver a hidropisia fetal não imune, como o resultado de uma anemia que leva à falência cardíaca e à um edema generalizado<sup>147</sup>.

A patogênese do dano fetal, é semelhante à de pacientes com CAT em que os eritrócitos têm uma vida útil reduzida, e caracterizada via ultrassonografia com ascite, edema de pele, pleura e na placenta, além de efusão pericárdica <sup>148</sup>. Eritroblastos no fígado fetal podem exibir sinais de infecção pelo B19V, como a presença de DNA do B19V<sup>82</sup>. A infecção intrauterina é persistente e caracterizada por anemia grave, falência cardíaca e morte <sup>149</sup>. A circulação diminuída devido à miocardite fetal pode contribuir para a acumulação de fluidos<sup>150</sup>. O B19V também pode estar associado a casos de morte fetal intrauterina não-hidrópica <sup>151</sup>.

A incidência de infecção primária de B19V durante a gestação foi estimada em 1 a 5% <sup>152-154</sup> e a transmissão transplacentária subsequente é de 24 a 33%, felizmente em sua maioria com desfecho favorável<sup>155,156</sup>. Essa incidência é aumentada em períodos epidêmicos, durante períodos com clima temperado no final do inverno e começo da primavera, podendo chegar de 3 a 20% com taxas de soroconversão materna de 3 a 24% <sup>157</sup>.

O risco de desenvolver hidropisia após esta infecção é variado (0 a 24%) <sup>158,159</sup>, mas, a taxa é provavelmente bastante baixa (1 a 1,6%), <sup>153,160</sup>. A chance de desfecho fetal adverso após a infecção parece ser maior entre 11 e 23 semanas de gestação, o que se correlaciona com o período hepático de atividade hematopoiética <sup>161,162</sup>. Esse dado é corroborado por uma meta-análise publicada recentemente que demonstrou maior risco na infecção pelo B19V em gestantes com ~19 semanas <sup>163</sup>.

Diferentemente do que ocorre com Rubéola e Zika, a infecção por B19V não apresenta desfechos (ou sequelas) à longo prazo nos neonatos, segundo os estudos já realizados <sup>146,160,164,165</sup>. Entretanto, Nagel e colaboradores<sup>166</sup> demonstraram em 5 de 16 neonatos que foram infectados pelo B19V apresentavam anormalidades no

neurodesenvolvimento. Estas anormalidades estão relacionadas a uma maior exposição do feto à anemia ou a hidropsia fetal.

### **1.6.5 Hepatite**

O espectro de doenças hepáticas associadas ao B19V é amplo, podendo variar da elevação nas transaminases hepática à falência hepática aguda (FHA ou ALF) e pode ocorrer em 4,1% de pacientes infectados por esse vírus<sup>167</sup>. Doenças hepáticas associadas à infecção pelo B19V têm sido descritas em todos os grupos etários, de neonatos a idosos <sup>168</sup>, porém a incidência é muito rara.

Casos de hepatite aguda e de FHA têm sido descritos com maior frequência em grupos pediátricos, porém existem relatos em adultos. Em adultos a gravidade da doença é menor do que em crianças e pode ser manifestada em pacientes imunocompetentes ou imunodeficientes, com ou sem alterações hemolíticas <sup>169-175</sup>.

A FHA é uma manifestação clínica rara, ocorre em menos de 1% dos casos, e pode ser considerada como subdiagnosticada devido à falta de conhecimento dos médicos e a falta de testes <sup>176</sup>. A biópsia hepática de pacientes infectados e que apresentam FHA mostram colestase celular e canalicular, apoptose e necrose dependendo da condição do sistema imune do hospedeiro e da severidade do envolvimento hepático <sup>172</sup>.

Um único caso foi descrito associando hepatite colestatóica fibrosante à infecção pelo B19V em um paciente transplantado renal devido a uma nefropatia, que desenvolveu FHA, com todos os marcadores virais negativos, exceto para HBV e B19V DNA. O paciente veio a óbito e no momento não apresentava a presença de marcadores HBsAg e HBeAg, enquanto o B19V DNA se mostrou fortemente positivo no fígado <sup>177</sup>.

A coinfeção do B19V com outros vírus hepatotrópicos pode levar a FHA grave, quando comparados a infecção apenas pelo B19V ou pelos vírus hepatotrópicos <sup>178</sup>, podendo levar a uma grave icterícia, altos níveis de bilirrubina e de enzimas hepáticas, e a um desfecho clínico desfavorável, podendo culminar na morte da maioria dos pacientes

Em relação à hepatite crônica, existe uma associação à infecção pelo B19V em um relato de caso de um paciente com linfopenia <sup>179</sup>, ficando demonstrado que a persistência do B19V levando a ocorrência de hepatite crônica está diretamente correlacionada com a extensão do dano hepático <sup>180</sup>. Entretanto, a associação entre a infecção pelo B19V concomitante a coinfeções pelos vírus das hepatites B e C

gerando uma hepatite crônica não se mostrou verdadeira, pois não foram encontrados agravos no dano hepático<sup>181</sup>. É importante ressaltar que mesmo não havendo comprometimento hepático nesses casos de coinfeção, nenhum estudo foi feito com grandes coortes. Esses estudos são necessários para explorar o curso patológico da infecção pelo B19V associado à hepatite crônica e aos seus desfechos clínicos<sup>181,182</sup>.

Na hepatite associada a anemia aplástica (HAAA) ocorre uma hepatite aguda grave que pode culminar na falência da medula óssea e em uma pancitopenia<sup>183</sup>. Muitos vírus são conhecidos por causar HAAA em pacientes imunocomprometidos, como os vírus das hepatites A, B, C, D, E e G, citomegalovírus, vírus Epstein Barr, vírus Transmitido por Transfusão (TTV) e o B19V<sup>184</sup>.

O mecanismo pelo qual a infecção por B19V estaria relacionada à hepatite não está claro, mas alguns autores acreditam em dois efeitos que podem levar ao dano do fígado um efeito direto da infecção pelo B19V e um efeito indireto, imunologicamente mediado<sup>184,185</sup>.

O B19V só consegue completar o seu ciclo de replicação em células progenitoras eritroides e em outras células como os hepatócitos fetais, além de células de medula óssea e megacariócitos<sup>185</sup>. Como os hepatócitos conseguem expressar glicosídeos e glicoesfingolipídeos, que são os receptores para a adsorção do B19V, este vírus consegue entrar nos hepatócitos e estabelecer uma infecção<sup>186</sup>. Essa proteína viral tem a capacidade de levar a célula para a fase G1 do ciclo celular, tanto por uma maneira direta, como indiretamente através da indução da expressão de uma quinase dependente de ciclina (p21/WAF1). Nessa fase do ciclo, os hepatócitos são levados a induzir a apoptose, devido a ativação de caspase 3 e caspase 9, e esse seria o efeito direto do dano hepático causado pelo B19V<sup>104,185</sup>.

O efeito indireto desse dano hepático é causado pelo aumento da circulação de linfócito T CD8+ citotóxico, o qual leva a uma diferenciação defectiva e alterada de monócitos e macrófagos, causando uma diminuição na expressão de IL-1 e um aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo para o aumento do dano hepático e subsequentemente gerando uma hepatite aguda<sup>184</sup>.

### **1.6.6 Glomerulonefrite**

A ligação entre a infecção pelo B19V e a ocorrência de doença glomerular foi sugerida a partir de diversos relatos de casos que descrevem o início de síndromes nefríticas ou nefróticas após o início da infecção, com diversas apresentações clínicas e padrões histológicos sendo descritos<sup>187-197</sup>. A síndrome renal mais relatada à

infecção pelo B19V é a nefrítica aguda com hipocomplementemia, geralmente após um período prodrômico de febre, erupção cutânea e artrite (manifestação clínica prévia mais comum), mas a proteinúria na faixa nefrótica também é observada, inclusive em pacientes com doença falciforme<sup>187-190,192,198-201</sup>. A recuperação espontânea é comum, mas para alguns indivíduos a disfunção renal é persistente e com proteinúria<sup>202</sup>.

A deposição de imunocomplexos pode levar a um padrão de lesão consistente com glomerulonefrite pós-infecciosa. O desenvolvimento de autoanticorpos para cardiolipina, fosfolipídios e DNA de fita dupla foram relatados durante a infecção por B19V, e estes também podem contribuir potencialmente para a deposição *in situ* de imunocomplexos pré-formados<sup>203</sup>.

A infecção direta das células endoteliais glomerulares tem sido proposta como mecanismo de lesão renal em casos de microangiopatia trombótica e vasculite, podendo culminar em doença renal crônica<sup>204</sup>.

O impacto e o papel da infecção pelo B19V em pacientes com doença renal crônica não são conhecidos. No entanto, existem várias razões para pensar que o vírus pode ser um importante patógeno nessas populações. Para a maioria dos pacientes, a eritropoiese é mantida por agentes estimuladores da eritropoiese, e os glóbulos vermelhos podem ter uma vida útil mais curta no quadro de uremia. Essa combinação de fatores pode predispor esses pacientes a crises aplásticas transitórias potencialmente fatais associadas à infecção por B19V<sup>205</sup>. Além disso, alguns acreditam que a administração de eritropoietina durante a infecção pelo vírus pode facilitar a sua replicação, pois forneceria novas células-alvo<sup>206</sup>, prolongando assim a viremia e suas complicações associadas. No entanto, isso permanece controverso. A disseminação hospitalar da infecção em uma unidade de diálise fechada também é uma ameaça potencial, mas ainda não está bem descrito na literatura<sup>207</sup>.

É possível que a infecção persistente por B19V nesses pacientes crônicos em diálise possa se tornar clinicamente relevante após transplante renal e introdução de imunossupressores. O primeiro relato de infecção por B19V em um receptor de transplante renal foi publicado em 1986<sup>208</sup>. Desde então, numerosos casos de infecção após transplantes de órgãos sólidos foram relatados<sup>209-213</sup>.

Entre 1 e 12% dos receptores de transplante renal apresentam infecção sintomática por B19V durante o primeiro ano após o transplante<sup>213-215</sup>.

O diagnóstico de anemia associada a B19V nessa população pode ser desafiador por vários motivos. Muitas vezes há uma falta de sintomas clássicos

associados ao vírus, como EI e artrite, que podem fornecer pistas para o diagnóstico. A anemia é relativamente comum após o transplante, particularmente no período inicial pós-transplante, e pode ser multifatorial. Portanto, o B19V muitas vezes não é considerado na longa lista de causas de anemia, que inclui perda sanguínea aguda e crônica, supressão generalizada da medula óssea por imunossupressores e medicamentos antivirais, disfunção do enxerto, deficiência de ferro, hiperparatireoidismo, uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina, e outras infecções virais mais comuns, como citomegalovírus. Além disso, neutropenia, trombocitopenia ou pancitopenia podem ocasionalmente acompanhar a anemia, ampliando ainda mais o diagnóstico diferencial <sup>211</sup>.

### **1.6.7 Miocardite**

A miocardite é a inflamação do miocárdio, a camada muscular da parede do coração, e pode ser observada em uma ampla gama de pacientes. Os sintomas incluem dor torácica e insuficiência cardíaca, e a doença pode resultar em morte súbita cardíaca em adolescentes jovens. A maioria dos indivíduos acometidos com miocardite se recupera, mas uma proporção desses pacientes (até 20%) pode desenvolver miocardite crônica, levando a cardiomiopatia dilatada e a insuficiência cardíaca congestiva<sup>216</sup>.

Diversos vírus têm a capacidade de infectar o coração podendo causar miocardite aguda e crônica <sup>216</sup>, com a persistência do vírus estando relacionada ao desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada <sup>217,218</sup>. Nas últimas décadas, observou-se uma mudança no perfil de vírus encontrados em maior frequência nas biópsias endomiocárdicas: de adenovírus e enterovírus, para o B19V e herpesvírus humano-6 (HHV-6) <sup>216,219,220</sup>. No coração, o B19V tem sido associado a miocardite, rejeição de aloenxerto em crianças e miocardite após transplante cardíaco <sup>221,222</sup>, portanto, o B19V pode ter papel causal na miocardite aguda e fatal em crianças e adultos, refletindo sua natureza patogênica<sup>223,224</sup>.

Por meio de técnicas moleculares, o B19V DNA tem sido frequentemente detectado em pacientes com miocardite e cardiomiopatia dilatada. No entanto, esse vírus também é encontrado em corações de pacientes sem evidência dessas doenças <sup>225,226</sup>, apresentando alto grau de variabilidade quanto à sua prevalência e carga viral. Portanto, o significado clínico do B19V no miocárdio permanece incerto e está atualmente em debate.

O B19V infecta e se replica em células progenitoras eritroides, porém ele também pode entrar nas células endoteliais das arteríolas, vênulas e capilares coronarianos, mas normalmente não consegue se replicar nesses locais<sup>227,228</sup>. No entanto, durante a miocardite viral, o B19V se replica nessas células endoteliais, induzindo danos cardíacos diretamente (efeito citopático viral) e indiretamente (pelo recrutamento de uma resposta imune exacerbada)<sup>229</sup>. Os fatores que possibilitam a replicação do B19V no endotélio e induzem a miocardite ainda são desconhecidos.

A patogênese da miocardite viral é um processo trifásico<sup>216</sup>, que varia entre os diferentes vírus cardiotrópicos<sup>230</sup>. Para o B19V a primeira fase é caracterizada pela entrada celular e início da inflamação e disfunção endotelial. A segunda fase consiste principalmente no acúmulo intravascular, adesão e penetração de células inflamatórias. A fase final representa a eliminação do vírus e a reparação e remodelação cardíaca pelo sistema imune adaptativo. No entanto, a depuração viral completa da doença cardíaca associada ao B19V é observada apenas em aproximadamente um terço dos pacientes. Após a eliminação completa do vírus, a inflamação pode ser mantida devido ao mimetismo molecular<sup>231</sup>.

## 1.7 Tratamento e prevenção

Não existe um tratamento específico para a parvovirose, sendo tratados apenas os sintomas e os sinais clínicos. Alguns pacientes que apresentam poliartropatias, podem requerer o uso de drogas anti-inflamatórias, para amenizar as dores nas articulações<sup>232</sup>.

Transfusões de eritrócitos são necessárias em pacientes com crise aplástica transitória, enquanto a medula óssea se recupera<sup>233</sup>. Este tratamento também pode ser recomendado em casos de hidropsia fetal, pois já foi observado que com a transfusão de eritrócitos, a taxa de mortalidade reduz em 18%<sup>234</sup>.

O tratamento com imunoglobulinas intravenosas pode melhorar os sintomas de anemia, porém pode causar o desenvolvimento de exantemas e artropatias. Esse tratamento também tem sido utilizado em pacientes com infecção persistente que desenvolvem doenças graves<sup>235</sup>.

Um estudo *in vitro* foi realizado para avaliar o uso da droga Cidofovir na replicação do B19V. Essa droga é utilizada para bloquear a DNA polimerase viral de vírus de DNA fita dupla que infectam humanos. No caso do B19V, um vírus de DNA fita simples e que utiliza a polimerase celular, o composto também inibiu

eficientemente, e de maneira dose dependente, a replicação do DNA viral, porém são necessários estudos *in vivo* para avaliar a eficácia antiviral do composto <sup>236</sup>.

Um método de prevenção que vem sendo estudado nas últimas décadas é uma vacina recombinante, composta pelas proteínas VP1 e VP2 expressas como VLP, a partir do sistema de expressão em Baculovirus, e que demonstrou promover uma resposta de anticorpos neutralizantes em adultos. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender a sua eficácia frente à infecção pelo B19V. Um ensaio clínico de fase I da vacina descrita anteriormente foi realizado em conjunto com o adjuvante MF59. Os voluntários vacinados receberam duas doses da vacina por via intramuscular e todos apresentaram soroconversão de anticorpos anti-B19V <sup>44,237</sup>. Os anticorpos neutralizantes foram detectados no soro por 6 meses após a terceira dose da vacina <sup>237</sup>. As avaliações de segurança da vacina mostraram reações moderadas nos voluntários em um primeiro ensaio clínico, porém no segundo ensaio clínico, a vacina foi descontinuada devido a erupções cutâneas que apareceram no local de aplicação <sup>238</sup>. Uma sugestão encontrada para essa reatogenicidade cutânea inesperada pôde ser a presença de contaminantes antigênicos de Baculovirus <sup>239</sup>.

Uma segunda geração de vacinas para o B19V, utilizando o sistema procarioto de *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido relatado, devido ao seu melhor custo e ausência dos referidos contaminantes, em relação ao sistema de Baculovirus<sup>240</sup>. Essa vacina foi administrada e testada em modelo murino de anemia falciforme com infecção respiratória e se mostrou uma excelente candidata a vacina, uma vez que foram observadas respostas rápidas e robustas de anticorpos neutralizantes <sup>241</sup>.

## 1.8 Diagnóstico

Uma das primeiras formas de diagnosticar a infecção de B19V em crianças se dá através do diagnóstico clínico, pela observação dos sintomas e sinais do eritema infeccioso. Porém o diagnóstico clínico é dificultado devido à infecção por B19V não manifestar um padrão exantemático típico e à semelhança com manifestações típicas de rubéola <sup>27</sup>. Portanto, ferramentas para o diagnóstico laboratorial, tanto de natureza sorológica quanto molecular vêm sendo constituídas para o diagnóstico específico do B19V.

### 1.8.1 Diagnóstico sorológico

O padrão ouro de diagnóstico laboratorial para a infecção pelo B19V é a detecção de anticorpos específicos, de classe IgM e IgG, em amostras de soro. Vários testes sorológicos comerciais foram desenvolvidos para o diagnóstico de B19V, com o uso de antígenos sintéticos e recombinantes, através da expressão das proteínas VP1 e VP2 do B19V em sistemas de baculovírus recombinante. Este sistema forma um capsídeo vazio e se observa a ocorrência frequente de perda dos epítomos conformacionais desses antígenos, reduzindo a sensibilidade e a especificidade dos testes comerciais e aumentando a indicação de resultados falso positivos e falso negativos <sup>242-245</sup>.

Na Noruega, cinco *kits* sorológicos e comerciais foram avaliados, quanto a sua especificidade, com o resultado de 70,1% a 94,8%, porém a sensibilidade dos testes não foi testada. <sup>245</sup>. Em um estudo conduzido na Suécia, quatro *kits* diagnósticos foram avaliados, e apresentaram sensibilidade de 90% a 97% e especificidade de 88% a 96% <sup>244</sup>. Um terceiro estudo avaliou somente a sensibilidade de três *kits* de ELISA, avaliando anti-B19V IgM e anti-B19V IgG, com uma sensibilidade de 92,3% a 100% para IgM e 97,9% a 99,5% para IgG <sup>242</sup>. De maneira geral, os testes comerciais apresentam sensibilidade que variam de 90% a 100% e especificidade de 70% a 96%.

Estudos recentes recomendam correlacionar a detecção molecular do genoma viral e a detecção de anticorpos específicos contra o vírus para um diagnóstico laboratorial preciso da infecção pelo B19V <sup>246</sup>. Essa correlação é necessária devido à possibilidade de resultados falso-negativos, uma vez que anticorpos contra as proteínas virais VP1 e VP2 podem estar complexados com as partículas virais e consequentemente se tornar indetectáveis em ensaios sorológicos <sup>98</sup>. Além disso, em se tratando da infecção persistente do vírus, é importante determinar a carga viral, bem como os anticorpos encontrados <sup>93</sup>.

### **1.8.2 Diagnóstico molecular**

O diagnóstico molecular para a infecção pelo B19V foi precocemente estabelecido, devido às dificuldades de se propagar o vírus em cultura de células convencionais. Este teste é feito por meio da detecção do DNA viral, a partir da amplificação de sequências do genoma do B19V através da PCR e PCR em tempo real, utilizando conjuntos de oligonucleotídeos que podem detectar diferentes regiões do genoma viral, principalmente para as proteínas virais NS1, VP1 e VP2 <sup>247-249</sup>.

Esse tipo de diagnóstico é importante para: pacientes com crise aplástica transitória, pois com a viremia é possível detectar o DNA do B19V no sangue antes



da resposta de anticorpos, por isso antes da possibilidade do uso do diagnóstico sorológico; pacientes imunossuprimidos com anemia persistente, pois estes não apresentam resposta imune humoral adequada, passível ao diagnóstico sorológico)<sup>27</sup>; além disso, para a genotipagem do B19V, é realizado o sequenciamento total ou parcial do genoma <sup>250</sup>.

Os ensaios de diagnóstico molecular, baseados em PCR qualitativa (ou PCR convencional) apresentam um limite de detecção de  $10^2$  a  $10^5$  cópias/mL<sup>251,252</sup>. Além disso, outra metodologia, a nested PCR, que se baseia em duas reações de PCR com conjuntos de oligonucleotídeos diferentes, aumenta esse limite de detecção para 1 a 10 cópias/mL<sup>94,253-256</sup>.

Além dessas metodologias, o diagnóstico molecular também inclui a PCR quantitativa, baseada nas metodologias *Sybr green*<sup>®</sup> e TaqMan<sup>®</sup> de PCR em tempo real. Foi relatado na literatura que existe a necessidade de se correlacionar a presença de anticorpos com a carga viral presente na amostra, para mostrar a persistência do B19V <sup>93</sup>. Para determinar a carga viral das amostras clínicas, a metodologia utilizada é a PCR em tempo real. A PCR em tempo real é mais sensível que a PCR convencional e a nested PCR. Além disso, essa metodologia pode ser estabelecida e padronizada *in house* e por não depender de géis de agarose com brometo de etídeo são mais seguras e com menor chance de contaminação, pois não ocorre manipulação do produto amplificado <sup>257-260</sup>.

Embora não exista um consenso sobre qual seria a amostra clínica e o método de detecção de DNA do B19V mais apropriado para o diagnóstico, alguns autores sugerem que amostras pareadas de tecido e soro sejam o ideal para estudos em pacientes com infecção persistente ou em gestantes <sup>261</sup>.

Uma limitação da detecção molecular do vírus é a impossibilidade de confirmar a presença de partículas virais infecciosas (vírions) ou somente o material genético livre de capsídeo (DNA *naked*), portanto não infeccioso. Para tentar dirimir esta limitação vários grupos de pesquisas, ao redor do mundo, vêm investigando o uso de componentes, como a enzima Benzonase<sup>®</sup>, para remover o DNA *naked* antes do momento da extração de DNA, para que o diagnóstico molecular, seja somente, em teoria, de partículas virais infecciosas <sup>262-264</sup>.

## 1.9 Epidemiologia

O B19V possui distribuição mundial, uma vez que as manifestações clínicas relacionadas à infecção por esse vírus são relatadas em diferentes países de todos os continentes. A infecção pelo B19V é exclusivamente humana e pode ocorrer em qualquer faixa etária. A prevalência de anticorpos anti-B19V na população varia de acordo com a idade, aumentando de 2-20% em crianças com menos de 5 anos, para 15-40% em crianças e adolescentes de 5-18 anos e 40-80% na população adulta <sup>265</sup>. Mulheres em idade reprodutiva possuem uma taxa de soroconversão anual de 1,5%, e como no grupo populacional de gestantes a doença tende a ser mais grave, é importante que o acompanhamento médico da gravidez com a detecção de B19V seja realizado <sup>266</sup>.

Em indivíduos adultos e saudáveis, a frequência de anticorpos IgG anti-B19V em diferentes países pode ser variável: 44% de positividade no Chile <sup>267</sup>; 44,1% na República Checa <sup>268</sup>; 50% na Índia <sup>269</sup>, Estados Unidos <sup>270</sup> e Japão <sup>271</sup>; 51,2% na Espanha <sup>272</sup>; e 60%-70% na Inglaterra e em País de Gales <sup>273,274</sup>.

Estudos soropidemiológicos realizados no Brasil <sup>11,275-277</sup> revelaram que a infecção pelo B19V é comum em alguns estados do país: foi relatada uma prevalência global de 43% nas áreas urbanas de Belém <sup>275</sup> e de 72% no Rio de Janeiro <sup>11</sup>. Em um estudo realizado em Niterói-RJ a prevalência encontrada foi de 32% de casos da infecção por Parvovírus B19 entre pacientes com doença exantemática <sup>278</sup>. Em relação à faixa etária na população brasileira, a presença de anticorpos anti-B19V é bastante alta, 72% em adultos de 31 a 40 anos e 87% em recém-nascidos. Entretanto, os anticorpos de origem materna decrescem até os 19 meses. Em contrapartida, as populações indígenas, no Pará, apresentam uma baixa frequência de anticorpos, cerca de 10,7% <sup>275</sup>.

A presença de eritema infeccioso, uma das manifestações clínicas mais comuns da infecção por B19V, exibe uma variação sazonal, ocorrendo principalmente durante os meses do final do inverno e início da primavera. A taxa de infecção que apresenta um caráter clínico pode subir para um nível epidêmico a cada 4 a 5 anos, o que é então refletido na comunidade por um número aumentado de crianças com eritema infeccioso ou crise aplástica transitória <sup>27</sup>. Durante os surtos de eritema infeccioso ou crise aplástica induzida por B19V, 10% dos casos ocorrem entre crianças de 5 anos de idade, 70% dos casos ocorrem em crianças de 5 a 15 anos e 20% de pacientes com idade superior a 15 anos <sup>279</sup>.

Uma propagação secundária a contactantes soronegativos é muito comum. Em ambientes escolares ou domiciliares, a taxa de ataque secundário durante as epidemias de eritema infeccioso é de cerca de 50% em crianças susceptíveis e de 20 a 30% em professores susceptíveis<sup>86,280</sup>. Além dos professores, o risco ocupacional mais alto de infecção é geralmente encontrado em pessoas em contato próximo com crianças, como atendentes de creche (9%) e donas de casa (9%), enquanto as mulheres que trabalham em outros locais têm um risco reduzido (4%)<sup>281,282</sup>.

A transmissão da infecção pode ocorrer pelas seguintes vias: i) através da via respiratória, ii) através de produtos derivados do sangue administrados por via parenteral e iii) verticalmente da mãe para o feto. O intervalo de tempo entre o surgimento de um caso e outro caso de contactante suscetível é de 6 a 11 dias, independentemente do tipo de doença relacionada ao B19V. A transmissão vertical pode ocorrer em um terço dos casos envolvendo infecções maternas primárias confirmadas sorologicamente, com uma taxa de transmissão de 25-50%. A transmissão nosocomial tem sido descrita com pouca frequência, e também tem sido relatada transmissão entre os profissionais de laboratórios que manipulam vírus nativos<sup>283-287</sup>.

Embora normalmente mais da metade da população adulta já tenha sido exposta, é difícil detectar a viremia, ou seja, presença de DNA do B19V no sangue de pacientes imunologicamente normais. Estudos relatam que a presença de DNA-B19V em doadores de sangue voluntários é de cerca de 0,0006% a 1,3% em todo o mundo, dependendo se estes estudos são realizados em épocas de epidemia de eritema infeccioso<sup>288</sup>. Em um estudo realizado em Niterói, Setúbal e colaboradores encontraram uma prevalência de 0,69% de bolsas de sangue positivas para DNA-B19V<sup>87</sup> e 1% em São Paulo<sup>289</sup>, porém não existe uma prevalência para todo o país ou legislações nacionais que determinam os níveis de DNA-B19V aceitáveis nas bolsas de sangue para que possam ser utilizadas. Nos Estados Unidos e na Europa, as legislações da *Food and Drug Administration* e na *Pharmacopeia* Europeia recomendam que a concentração de DNA-B19V em bolsas de sangue e hemoderivados não ultrapassem  $10^4$ UI/mL, a fim de se evitar a transmissão por transfusão<sup>37,290,291</sup>.

O risco de transmissão por hemoderivados a partir de doadores de sangue é baixo, mas, como um grande número de doações de sangue compõem os *pools* de plasma usados para produzir hemoderivados, estes podem muitas vezes estar contaminados<sup>292</sup>. Estudos relatam a detecção de B19V em bolsas de sangue, mesmo

com uma aparente eliminação do vírus, por fracionamento, por aquecimento e por uso de solventes e detergentes <sup>291</sup>.

Estudos relatam a presença de DNA do B19V em concentrados de fatores de coagulação submetidos a inativação viral, com uma soroprevalência de 90% entre os hemofílicos, correlacionando-se com a quantidade de fator de coagulação recebida<sup>143,293</sup>. O B19V também pode ser transmitido por medula óssea <sup>294</sup>e produtos derivados do sangue, tais como plaquetas <sup>295</sup>, imunoglobulina intravenosa <sup>296</sup> e produtos de fibrina <sup>297</sup>. A infecção por B19V e a soroconversão têm sido observadas em pacientes após receber tratamento com solvente ou unidades de plasma tratadas com detergente. <sup>95,298</sup>.

### 1.10 Justificativa

Uma grande variedade de vírus compartilha a capacidade de causar exantemas, tornando a identificação etiológica exclusivamente através do exame clínico, uma tarefa muito difícil. Os agentes mais comuns de doença exantemática (DE) incluem o vírus do Sarampo, Rubéola, Dengue, Varicela, Citomegalovírus, Epstein Barr, Herpesvírus Humano 6, Enterovírus, Parvovírus Humano B19, Chikungunya e Zika<sup>98,299</sup>. Apesar dessas DE serem comuns no Brasil, existem diversas dificuldades em determinar um diagnóstico etiológico preciso.

O diagnóstico diferencial de DE é de suma importância, não só para fins epidemiológicos, bem como para o controle e erradicação das infecções. Mesmo que a maioria dessas infecções tenha um curso benigno e autolimitado, para certos grupos etários, assim como gestantes e imunocomprometidos, algumas infecções representam um risco importante, pois podem evoluir para anemias graves, que poderão necessitar de transfusões sanguíneas e internação hospitalar de emergência, onerando o serviço público de saúde <sup>300</sup>. Por isso, é de grande importância averiguar o diagnóstico etiológico que pode estar implicado na DE, afim de garantir um tratamento adequado e estabelecer as medidas necessárias para o controle da doença <sup>278,301</sup>. Um estudo publicado em 2003 mostrou que cerca de 19% dos casos de DE permanecem sem o diagnóstico confirmatório e entre esses casos a infecção pelo B19V é a maior causa (33%), demonstrando a necessidade da realização do diagnóstico laboratorial específico <sup>302</sup>.

Em relação às doenças febris agudas (DFA), uma revisão recente sobre a epidemiologia na América Latina, demonstrou que entre 2007-2016, na cidade do Rio

de Janeiro, 40% dos casos de DFA não apresentavam uma etiologia definida, reforçando a necessidade do diagnóstico diferencial de B19V entre esses casos<sup>303</sup>.

No caso de pacientes com doença renal crônica, a avaliação da infecção pelo B19V se faz necessária, uma vez que foi demonstrado que tanto a transfusão sanguínea quanto o tempo de diálise atuam como fatores de risco para infecções virais adquiridas em diálise clínica<sup>304</sup>. A contaminação viral pode ocorrer percutaneamente durante a punção, através de acidentes de diálise com derramamento de sangue contaminado e até via o próprio procedimento de diálise<sup>305</sup>.

Estudos prospectivos do curso da infecção por B19V em pacientes com infecção aguda, representam uma lacuna no entendimento da infecção persistente, com possível desenvolvimento de manifestações clínicas atípicas. Tais relatos, principalmente em populações brasileiras, não foram ainda documentados e portanto, são de suma importância para a Saúde Pública.

As manifestações hepáticas causadas por B19V variam desde alterações bioquímicas no fígado à falência hepática aguda (FHA)<sup>93,168</sup>. A detecção de B19V DNA foi descrita em cerca de 28% dos pacientes que receberam transplante de fígado devido a hepatite sem etiologia definida (também chamada de hepatite não-A, -B, -C, -E ou hepatite criptogênica). Existem pacientes adultos imunocompetentes infectados pelo B19V (anti-B19V IgM reagente e B19V DNA detectável) com achados bioquímicos compatíveis a hepatite aguda<sup>171,172,174,306</sup>. Esses dados sugerem que o B19V é uma das causas de hepatite e pode, portanto, ser subdiagnosticado como vírus hepatotrópico<sup>307</sup>. No entanto, os mecanismos de injúria hepática causada por B19V ainda não são conhecidos. Estudos prévios demonstraram o B19V DNA em amostras de tecido hepático de 67% de pacientes com FHA criptogênica, sugerindo que o B19V pode ser um possível agente de FHA<sup>308,309</sup>.

A detecção de B19V DNA no sangue e em tecidos através da PCR, não implica necessariamente que a sua replicação esteja ocorrendo e que vírions infecciosos estejam presentes. Molennar-de-Backer e colaboradores<sup>262</sup>, propuseram que remanescentes de DNA do B19V pode ser liberado de tecidos sem replicação ativa, sugerindo que o papel assumido pelo B19V em síndromes clínicas como miocardite e artrite, baseada principalmente na detecção de B19V DNA no sangue, deve ser cuidadosamente reconsiderada. Tem sido proposto que a persistência do DNA viral em tecidos pode ser considerada como fonte alternativa de liberação do DNA viral, sugerindo que os danos nos tecidos poderiam levar à liberação passiva do B19V DNA<sup>225,310</sup>. Desta forma, estabelecer a natureza do B19V DNA em um paciente é uma

questão de importância teórica e prática, uma vez que esta diferenciação pode ser relevante para a segurança transfusional, transplante e manejo das doenças relacionadas ao vírus. O DNA viral passivamente lançado pode ser interpretado como causalmente irrelevante e não infeccioso. Enquanto que, o DNA viral produzido por replicação viral indica infecção ativa e infecciosidade. Além disso, essa diferenciação permite esclarecer o papel do B19V, como agente etiológico das diferentes manifestações clínicas atípicas sugeridas para a infecção persistente pelo B19V <sup>263</sup>.

Embora os estudos correlacionando a presença de B19V DNA em múltiplos tipos de tecidos com o desenvolvimento de manifestações clínicas atípicas sejam limitados e frequentemente contraditórios, tem sido proposto que o desenvolvimento de doenças em tecidos não eritróides relacionadas à infecção pelo B19V está associada a mecanismos diretos e indiretos <sup>56,311</sup>. O mecanismo direto estaria relacionado à citotoxicidade da proteína NS1 viral, que apresenta efeitos no ciclo celular levando à ativação de caspases que induzem a apoptose das células hospedeiras <sup>105,185</sup>. O mecanismo indireto seria através da injúria inflamatória mediada imunologicamente, que causa uma diminuição na expressão de IL-1 e um aumento de IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , contribuindo para o aumento no dano tecidual <sup>184</sup>.

Dessa forma, a infecção experimental em primatas não-humanos seria uma ferramenta importante para fornecer evidências experimentais sobre a correlação entre a infecção persistente e a progressão de doenças e os possíveis mecanismos implicados na ocorrência de manifestações clínicas atípicas da infecção em tecidos não eritróides. Um estudo publicado pelo grupo do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) demonstrou que macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) são susceptíveis a infecção pelo B19V e desenvolvem uma infecção semelhante ao que ocorre em humanos, caracterizado pela alta viremia associada com uma detecção de anticorpos específicos e depressão de progenitores eritroides, representando um bom modelo animal para o estudo desta infecção <sup>312</sup>.

### 1.11 Hipótese

O B19V DNA pode persistir no sangue e em tecidos durante meses após a resolução da infecção aguda e desta forma, pode estar associado a manifestações clínicas atípicas em tecidos não eritroides, como a falência hepática aguda.

Além disso, o B19V deve ser incluído no diagnóstico diferencial de infecções virais em grupos populacionais específicos, por ser um importante agente etiológico de anemias graves.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Otimizar ferramentas de diagnóstico e realizar o diagnóstico diferencial laboratorial da infecção aguda e persistente causada pelo Parvovirus humano B19 em amostras obtidas de pacientes com falência hepática aguda, doença renal crônica, doenças exantemáticas e febris agudas, bem como avaliar aspectos clínicos e imunopatogênicos dessa infecção.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar um PCR em tempo real para diagnóstico qualitativo e quantitativo do Parvovirus B19 em amostras de soro e tecido hepático;
- Avaliar um teste laboratorial baseado em um tratamento das amostras clínicas com endonuclease, seguido por PCR em tempo real, para o diagnóstico diferencial laboratorial entre infecção aguda ou persistente pelo Parvovirus B19;
- Realizar o diagnóstico diferencial laboratorial de Parvovirus B19 em pacientes com falência hepática aguda por diferentes etiologias de casos de hepatites: virais, medicamentosas e autoimunes. Além disso, avaliar o papel do B19V na patogênese da FHA por hepatite viral, através da análise dos transcritos de RNAm de B19V no fígado e caracterizar os genótipos de B19V circulantes na população, através de sequenciamento total do genoma viral.
- Realizar o diagnóstico diferencial laboratorial de Parvovirus B19 em pacientes com doença renal crônica submetidos à diálise, avaliando a frequência da infecção e os fatores de risco na infecção nessa população;
- Realizar o diagnóstico diferencial laboratorial de Parvovirus B19 em crianças, adolescentes e adultos com doenças exantemática e/ou com doenças febris agudas, avaliando a frequência da infecção e acompanhando o curso da infecção pelo B19V nos pacientes com infecção aguda, afim de observar a possível ocorrência de infecção persistente.



### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o doutorado para a composição da presente tese serão apresentados na forma de artigos publicados, ou submetidos à publicação em revistas indexadas. As seções apresentadas a seguir foram divididas, baseando-se nos objetivos específicos da tese: (I) Otimização de teste diagnóstico por PCR em tempo real; (II) Otimização de um método molecular para discriminação de DNA *naked* e associado a virion em amostras clínicas; (III) Diagnóstico diferencial de Parvovirus B19 em pacientes com falência hepática aguda; (IV) Diagnóstico laboratorial de Parvovirus B19 em pacientes com doença renal crônica; (V) Diagnóstico diferencial para doenças exantemáticas e doenças febris agudas.

#### 3.1 Otimização de teste diagnóstico por PCR em tempo real

**Título:** *Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients*


**Autores:** Arthur Daniel Rocha Alves, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Oswaldo Gonçalves Cruz, Marcelo Alves Pinto, Luciane Almeida Amado Leon.

**Revista:** Publicado no periódico *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Fator de impacto = 5.225 e Qualis para Medicina 2 = A2).

**Resumo:** Parvovírus humano B19 (B19V) é um patógeno comum em todo o mundo. Após infecção primária, o DNA do B19V pode persistir permanentemente em tecidos não eritroides, incluindo o fígado de pacientes com falência hepática aguda (FHA). O objetivo do estudo foi otimizar o PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação do B19V-DNA, de modo a estabelecer um diagnóstico diferencial da infecção por B19V em pacientes com FHA. As técnicas de qPCR foram baseadas nas metodologias Sybr green® e TaqMan®. Para avaliar os parâmetros de qualidade de ambas as metodologias, amostras de pacientes com e sem a infecção por B19V foram testados. O uso diagnóstico da qPCR foi avaliado com a detecção de B19V-DNA em 10 pacientes com FHA através da testagem em amostras armazenadas de soro e

tecido hepático. A metodologia Sybr green<sup>®</sup> apresentou 97% de eficiência, com limites de detecção e quantificação de 62,6 e 53.200 cópias/mL, respectivamente. A metodologia TaqMan<sup>®</sup> apresentou 95% de eficiência, com limites de detecção e quantificação de 4,48 e 310 cópias/mL, respectivamente. Um resultado falso positivo foi encontrado apenas para a metodologia de Sybr green<sup>®</sup>. Entre os pacientes com FHA sem etiologia definida, 3 (30%) foram positivos para o B19V-DNA tanto no soro quanto no tecido hepático. Como conclusão a técnica de qPCR otimizada no presente estudo foi efetiva para o esclarecimento de casos incomuns de FHA relacionada ao B19V e são adequados para diagnóstico diferencial de FHA.

## Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients

Arthur Daniel Rocha Alves <sup>a</sup>, Rita De Cassia Nasser Cubel Garcia<sup>b</sup>, Oswaldo Gonçalves Cruz<sup>c</sup>, Marcelo Alves Pinto<sup>a</sup> and Luciane Almeida Amado Leon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; <sup>b</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil; <sup>c</sup>Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

### ABSTRACT

**Background:** Human Parvovirus B19 (B19V) is a common pathogen worldwide. After primary infection, B19V-DNA may permanently persist in non-erythroid tissues, including the liver of patients with acute liver failure (ALF).

**Objective:** To validate a real-time PCR (qPCR) for the quantification of B19V-DNA, in order to establish a differential diagnosis for B19V infection in ALF patients.

**Methods:** The qPCR techniques were based on Sybr Green<sup>®</sup> and TaqMan<sup>®</sup> methodologies. To evaluate the quality parameters of both methods, samples from patients with or without B19V infection were tested. The diagnostic utility of qPCR in the detection B19V-DNA in patients with ALF was evaluated by testing archived serum and hepatic tissue explants from 10 patients.

**Results:** The Sybr Green<sup>®</sup> methodology showed 97% efficiency, the limits of detection and quantification were 62.6 and 53,200 copies/mL, respectively. The TaqMan<sup>®</sup> methodology showed 95% efficiency, the limits of detection and quantification were 4.48 and 310 copies/mL, respectively. A false positive result was found only with the Sybr Green<sup>®</sup> methodology. Among ALF patients without defined etiology, three (30%) were positive for B19V DNA in serum and liver.

**Conclusion:** The qPCR methods validated here were effective in clarifying uncommon cases of B19V-related ALF and are fit for differential diagnosis of ALF causes.

### ARTICLE HISTORY

Received 12 September 2018  
Accepted 11 February 2019

### KEYWORDS

Acute liver failure; diagnostic; human parvovirus B19; real-time quantitative PCR; synthetic stand curve

## 1. Introduction

Human Parvovirus B19 (B19V) is a member of the *Erythroparvovirus* genus within the *Parvoviridae* family, characterized by a marked tropism for erythroid progenitor cells in the bone marrow [1]. The B19V genome is a single-stranded DNA molecule with approximately 5600 nucleotides, which encodes two capsid proteins (VP1 and VP2), and a single nonstructural protein (NS1) essential for viral replication [2].

B19V infects only humans and it usually causes mild and self-limiting clinical manifestations, such as erythema infectiosum and arthropathy. B19V infection can also cause transient aplastic crisis in patients with hemolytic disorders, persistent anemia in patients with immunodeficiency, hydrops fetalis during pregnancy and elevated severity in sickle-cell disease patients [2]. Furthermore, the spectrum of B19V-linked diseases has increased including myocarditis, neuromyelitis and hepatitis due to improvements in molecular diagnosis [3–6].

Undefined causes for acute or chronic hepatitis represent a significant proportion of hepatitis cases (17%) [7]. Previous studies have demonstrated biochemical changes compatible with acute hepatitis in adult patients infected with B19V without any serological or molecular evidence of previous hepatitis A, B, C or E viral infection [8–14]. These findings have

associated the B19V infection with development of acute hepatitis of unknown etiology [15].

Hepatic diseases caused by B19V infection can range from biochemical changes to acute liver failure (ALF), and may occur in 4.1% of patients infected with this virus [15,16]. B19V has been proposed to cause ALF in patients with, or without, aplastic anemia, based on isolation and characterization of B19V genome in hepatic tissue [17–22].

Previous studies have reported a high prevalence of B19V-DNA associated with the livers of patients with liver disease, being detectable for years after acute infection, which suggests the presence of persistent B19V-infection [17,23–25]. Moreover, human parvovirus B19V infection was frequently found in patients with chronic HBV or HCV infection [26–28]. According to Dwivedi et al., the disease severity and poor outcome were significantly greater in B19V-positive patients coinfecting with hepatitis A to E [26].

The similarity of B19V clinical manifestations with other exanthematous diseases makes clinical diagnosis difficult. B19V exanthem is highly variable and may be misdiagnosed when laboratory investigation is not available. Laboratory diagnosis of acute infection has been largely based on the detection of specific IgM in serum whereas specific IgG is consistent with previous B19V infection. A persistent infection has been



reported by the detection of low levels of B19V-DNA in serum and in several tissues from immunocompetent and immunocompromised subjects [24]. In this way, recent studies have recommended the association of serological and molecular assays to provide a precise diagnosis of B19V infection [29].

Thus, the relation between B19V viral load and specific antibody detection is essential to discriminate an acute from a persistent infection as well as to determine the etiological agent of acute hepatitis. The validation of real-time assays will be imperative in defining the diagnosis of parvovirus infection in serum and liver samples of patients with hepatitis, which is particularly important for transplantation purposes and disease management [30].

The objectives of this study were to standardize and validate a real-time PCR (qPCR) for detection and quantification of B19V-DNA, in order to establish a differential diagnosis for B19V infection in hepatitis-related patients.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Samples

In order to evaluate the accuracy of qPCR techniques to detect and quantify B19V-DNA, a reference panel was constructed consisting of:

- (i) sera samples from 33 patients with confirmed B19V infection (B19V-DNA positive and/or anti-B19V IgM positive): erythema infectiosum (n = 21), transient aplastic crisis (n = 6), coinfection with HIV (n = 5), asymptomatic blood donor (n = 1);
- (ii) sera samples from 38 patients with recent infections to other viruses (B19V-DNA and anti-B19V IgM negative): Dengue virus (n = 10), Rubella virus (n = 10), Human Immunodeficiency virus (n = 5), Hepatitis A virus (n = 4), Hepatitis B virus (n = 3), Human Bocavirus (n = 1), Human herpesvirus 6 (n = 1) and Human herpesvirus 1/2 (n = 4).

All these samples were provided by biorepositories from the Infectious Diseases Department of Fluminense Federal University in Niteroi-RJ, Brazil and the Laboratory of Technological Development in Virology of Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

In order to evaluate the performance of qPCR for detection of B19V infection among patients with acute liver failure, archived serum and hepatic tissue explant samples from patients with cryptogenic acute liver failure (n = 10) were tested. These patients, which were admitted to Hospital Federal de Bonsucesso (HFB), in Rio de Janeiro-RJ, were also tested by conventional PCR [31].

This study protocol was approved by the Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (protocol #1.896.353) and all patients signed the consent form.

### 2.2. DNA extraction

B19V-DNA extraction was carried out using a QIAamp DNA Blood Mini Kit for serum samples (Qiagen, Hilden, Germany) and QIAamp Fast DNA tissue Kit for hepatic tissue explant

samples, according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.3. Sybr green and Taqman quantitative real time PCR (qPCR) assays

Sybr Green and Taqman methods were utilized in order to compare accuracy and feasibility. Both qPCR systems were performed in the ABI Prism 7500 Real time PCR systems (Applied Biosystems, California, United States of America), directed to the NS1 region of the B19V.

For the Sybr Green assay, the primers used were E1905 Fwd nucleotides (nts) 2085 to 2102 (5' TGCAGATGCCCTCCACCCA 3') and E1987 Rev nts 2167 to 2187 (5' GCTGCTTCACTGAGTCTTC 3'), as previously described by Nguyen et al. [32]. The reactions were set up with 1x Sybr Green<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, United States of America), 20pmol of each primer, and 5 $\mu\text{L}$  of DNA, in a final volume of 20 $\mu\text{L}$ . The thermal conditions were: 1 cycle at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min and  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min; followed by 40 cycles (15 s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $60^{\circ}\text{C}$ ) and a final step of 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 20 s at  $60^{\circ}\text{C}$ , 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , to generate the dissociation curve.

For the Taqman system, the primers E1905/E1987 and the following probe were used: 5' 6FAM-ACCTCCAACCACCCCAA TTGTACA-MGBNFQ [33]. The reactions were set up with 1x Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, United States of America), 20pmol of each primer, 10pmol of Taqman probe and 5 $\mu\text{L}$  of DNA, in a final volume of 25 $\mu\text{L}$ . The thermal conditions were 1 cycle at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, and 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min.

The performance of the both qPCR systems were evaluated based on the analytical characteristics of the standard curve and dissociation curve obtained (for Sybr green assay).

### 2.4. Standard curve

Absolute quantification was determined by generating a synthetic standard curve that was designed [custom synthesized by IDT<sup>®</sup> (Coralville, USA)] based on the 104bp fragment from NS1 viral region of B19V (5' TGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCAACC ACCCCAATTGTACAGACACCAAGTATCAGCAGCAGTGTGTGGTAA-AGCTCTGAAGAACTCAGTGAAGCAGCT-3'). Serial dilutions from  $10^8$  to  $10^1$  copies/mL were used to generate the calibration curves for the qPCR assays.

### 2.5. Standardization qPCR for B19V

Each assay was designed to include negative and positive controls and the standard curve together with the test samples. All controls and samples were tested in at least two replicates. The experimental models followed the US Food and Drug Administration (FDA) and Brazilian Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) requirements that regulate the parameters to be evaluated in bioanalytical assays [34–36].

The limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) (analytical sensitivity) of both methodologies were established by evaluating four replicates of serial-log 10 dilutions (from  $10^8$  to 1.83 copies/mL) of a positive control sample

(B19V-DNA positive sample obtained from an asymptomatic blood donor).

The specificities of the optimized assays were examined by testing a panel of 33 positive and 38 negative controls described previously.

To determine the reproducibility and repeatability of both methodologies, sera from six patients with erythema infectiosum (anti-B19V IgM and B19V-DNA positive) were tested on three different days by the same operator (reproducibility) and in triplicate on the same day (repeatability). The following validation parameters obtained by the software SDS v1.2x System software (Applied Biosystems, California, United States of America) were analyzed in these assays: cycle threshold (Ct), mean of viral load, standard deviation, coefficient of variation (%), and the melting temperature (T<sub>m</sub>), for the Sybr Green system.

### 2.6. Evaluation of qPCR performance for diagnosis of the B19V and reference controls

Ten serum and hepatic tissue explant samples from patients with cryptogenic acute liver failure were tested in order to evaluate the performance of qPCR for detection of B19V among hepatitis-related patients.

After diagnosis of B19V infection, in order to exclude the possibility of false negative qPCR results due to PCR inhibitors, TaqMan® RNase P (Applied Biosystems, California, United States of America, catalogue number 4,316844), a commercial system of primers and probe to detect this common gene in human samples, was used. This reference control (RNase P) was added in six matched serum and hepatic tissue explant samples from the same patients with cryptogenic ALF. Among them, two were B19V-DNA positive (samples ALF001 and ALF002) and

four were B19V-DNA negative (samples ALF004-ALF010). All these samples were tested in four replicates. This reference control probe is 5' labeled with VIC fluorophore and 3' MGB, allowing the simultaneous detection of the NS1 B19V genome and human RNase P gene.

### 2.7. Statistical analysis

The correlation between variables was analyzed through the Spearman coefficient. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyzes including calculations of sensitivity, specificity and reproducibility of diagnostic tests were performed using the statistical program GraphPad InStat 3.0.1. (GraphPad Software, California, United States of America).

## 3. Results

### 3.1. Standardization of Sybr green and Taqman real-time PCR for B19V

The Sybr green and Taqman methodologies showed linearity over the range of  $10^8$  to  $10^1$  copies/mL ( $R^2 = 0.99$ ). The analytical characteristics of the standard curve in the Sybr green methodology were as follows: Correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.99, Slope of  $-3.37$ , Y-intercept of 39.30 and efficiency of 97%, at a T<sub>m</sub> of 81.5°C. In the Taqman methodology:  $R^2$  of 0.99, Slope of  $-3.46$ , Y-intercept of 39.76 and efficiency of 95% (Figure 1).

The limit of detection (LoD) of Sybr green and Taqman assays were  $6.26 \times 10^1$  copies/mL (Ct 35.21 and T<sub>m</sub> 81.5°C) and 4.48 copies/mL (Ct 36.06), respectively, as these were the lowest concentrations at which the positive control samples were detected in at least 50% of the replicates (Table 1). The

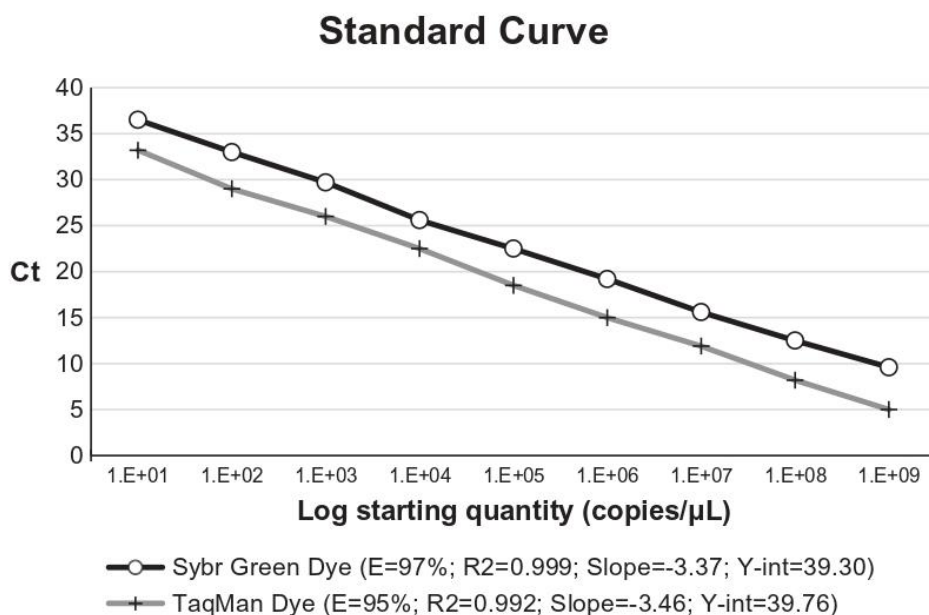


Figure 1. Analytical characteristics of the standard curves of the B19V qPCR in Sybr green and Taqman methodologies.

Ct: Cycle threshold; E: Amplification efficiency; R<sup>2</sup>: Coefficient of correlation; Y-int: Intercept



**Table 1.** Evaluation of the limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) of the B19V qPCR by Sybr green and Taqman methods.

Positive control dilutions (copies/mL)	Sybr Green				TaqMan		
	Mean Ct $\pm$ SD	Viral load (copies/mL)	Tm	Positive replicates/total of replicates	Mean Ct $\pm$ SD	Viral load (copies/mL)	Positive replicates/total of replicates
10 <sup>0</sup>	10.32 $\pm$ 0.16	3.80 $\times$ 10 <sup>8</sup>	81.5°C	4/4	8.57 $\pm$ 0.05	3.58 $\times$ 10 <sup>8</sup>	4/4
10 <sup>-1</sup>	14.56 $\pm$ 0.03	3.53 $\times$ 10 <sup>7</sup>	81.2°C	4/4	12.37 $\pm$ 0.17	4.17 $\times$ 10 <sup>7</sup>	4/4
10 <sup>-2</sup>	17.62 $\pm$ 0.35	4.83 $\times$ 10 <sup>6</sup>	81.2°C	4/4	15.29 $\pm$ 0.02	5.71 $\times$ 10 <sup>6</sup>	4/4
10 <sup>-3</sup>	20.89 $\pm$ 0.16	4.12 $\times$ 10 <sup>5</sup>	81.5°C	4/4	18.71 $\pm$ 0.14	5.73 $\times$ 10 <sup>5</sup>	4/4
10 <sup>-4</sup>	24.41 $\pm$ 0.42	5.32 $\times$ 10 <sup>4</sup>	81.5°C	4/4(LoQ)	22.65 $\pm$ 0.41	3.92 $\times$ 10 <sup>4</sup>	4/4
10 <sup>-5</sup>	27.13 $\pm$ 0.83	5.12 $\times$ 10 <sup>3</sup>	81.5°C	3/4	26.04 $\pm$ 1.11	4.40 $\times$ 10 <sup>3</sup>	4/4
10 <sup>-6</sup>	31.45 $\pm$ 1.17	4.65 $\times$ 10 <sup>2</sup>	81.2°C	3/4	30.37 $\pm$ 1.29	3.10 $\times$ 10 <sup>2</sup>	4/4 (LoQ)
10 <sup>-7</sup>	35.21 $\pm$ 3.45	6.26 $\times$ 10 <sup>1</sup>	81.5°C	2/4 (LoD)	33.99 $\pm$ 2.76	3.30 $\times$ 10 <sup>1</sup>	3/4
10 <sup>-8</sup>	ND	ND	ND	ND	36.06 $\pm$ 3.89	4.48	2/4 (LoD)

Ct: Cycle threshold; LoD: Limit of Detection; LoQ: Limit of Quantification; ND: Not detected; PC: Positive control; SD: Standard deviation; Tm: Temperature of melting

limit of quantification (LoQ) of Sybr green and Taqman was  $5.23 \times 10^4$  and  $3.1 \times 10^2$  copies/mL, respectively. These LoQ represents the lowest concentration at which all replicates tested are positive (Table 1), as recognized by ANVISA (Brazilian Health Surveillance Agency).

The Sybr green methodology showed 97.36% specificity ( $p = 0.0001$ , 95%CI 0.8619 to 0.9993), and the Taqman methodology showed 100% specificity ( $p = 0.0001$ , 95%CI 0.9075 to 1.000). Both qPCR methodologies showed a sensitivity of 100% ( $p = 0.0001$ , 95%CI 0.8943 to 1.000).

No cross-reaction was observed in the Taqman methodology when testing other viruses such as Rubella, Dengue, HIV, Hepatitis A, Hepatitis B, Human Herpes virus 1/2, Human Herpes virus 6 and Human Bocavirus. However, a B19V false-positive result was observed using the Sybr Green methodology, in a Dengue-positive sample (Anti-B19V IgM negative and IgG negative).

The precision of the methods was estimated by a panel of six positive samples represented in concentrations of high viral load ( $10^5$  copies/mL) ( $n = 3$ ) and average viral load ( $10^4$ – $10^3$  copies/mL) ( $n = 3$ ). The coefficient of variation (CV) was calculated between replicates tested on the same day (repeatability) and on three different days (reproducibility). The CV values varied from 0.07% to 2.10% for Sybr green and from 0.06% to 1.16% for Taqman methodologies (Table 2).

### 3.2. Performance of qPCR for differential diagnosis of B19V infection among patients with acute liver failure

Among ten patients with cryptogenic ALF, three were positive for B19V-DNA in serum and hepatic tissue explant through qPCR and only one in hepatic tissue explant, through qualitative PCR. All of them were IgG anti-B19V-positive and none of them were IgM anti-B19V-positive. The viral load in serum ranged from  $3.51 \times 10^3$  to  $8.52 \times 10^3$  copies/mL (mean of  $5.94 \times 10^3$  copies/mL), and in hepatic tissue explants from  $2.56 \times 10^4$  to  $1.65 \times 10^5$  copies/mL (mean of  $8.53 \times 10^4$  copies/mL) (Table 3).

### 3.3. Reference control

The results concerning the use of human RNase P gene as an endogenous internal amplification control, in the Taqman methodology, are summarized on Table 4. The RNase P gene was detected in both positive and negative B19V-DNA serum

and liver samples, showing there were no inhibition of qPCR. Despite a small variation for the RNase P Ct observed between serum (31.12 to 35.22) and hepatic tissues samples (16.01–25.44), through this analysis, there were no false negative results regarding the detection/quantification of B19V in these clinical samples, supporting the accuracy of the results.

## 4. Discussion

B19V-DNA detection is not performed routinely in clinical diagnosis of acute liver failure. For routine diagnostic laboratories of viral hepatitis, the assays used require validation to demonstrate fitness of a method for this purpose, which involves accuracy, precision, sensitivity and specificity. In the present study, a real time PCR was standardized and validated for detection and quantification of B19V DNA in order to establish a differential diagnosis for B19V in hepatitis-related patients. For this purpose, the detection limit tests (sensitivity), specificity, reproducibility (inter-test) and repeatability (inter-test) were analysed, following the Brazilian Health Surveillance Agency guidelines to validate bioanalytical methods [36].

In the present study, the absolute quantification of the viral load was determined through a synthetic standard curve from an oligonucleotide-ultramers relative to a 104bp sequence of NS1 region, that was designed instead of a conventional standard curve obtained from cloning, which requires a laborious and time-consuming methodology. Conventionally, standard curves are obtained from serial dilutions of sequences of the cloned viral DNA [37], but in the methodology described in this study the preparation of a synthetic standard curve was cheaper and faster than a cloned standard curve.

For the accurate detection of B19V infection in serum and liver specimens, it is important to assure the sensitivity of the method since a low B19V load has been observed in hepatitis-related patients ranging from  $10^2$  to  $10^4$  IU/mL. This is far below that observed in B19V acute infection, which ranges from  $10^4$  to  $10^{13}$  IU/mL. The limit of detection (LoD) of B19V-DNA using the Sybr green methodology was up to  $6.26 \times 10^1$  copies/mL (or  $2.45 \times 10^2$  IU/mL), and 4.48 copies/mL (or 14.96 IU/mL) using the Taqman methodology (conversion factor of 3.34, according to Koppelman et al [38]). This result corroborates the findings of previous studies that showed LoD varying from 6 geq/mL (20.04 IU/mL) to  $8 \times 10^5$  geq/mL ( $2.67 \times 10^6$  IU/mL) [39];  $10^2$  geq/mL ( $3.34 \times 10^2$  IU/mL) [40] and  $3.2 \times 10^1$  copies/mL ( $1.06 \times 10^2$  IU/mL) [41]. However, these LoD

Table 2. Precision of the B19V qPCR in Sybr Green and Taqman methodologies.

Replicates or Days	Repeatability						Reproducibility					
	Ct of high viral load samples (copies/mL)			Ct of average viral load samples (copies/mL)			Ct of high viral load samples (copies/mL)			Ct of average viral load samples (copies/mL)		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
1	29.37	31.17	28.12	25.81	27.15	Sybr Green 25.32	29.37	31.17	28.12	25.81	27.15	25.32
2	29.45	31.65	28.47	26.04	27.11	25.26	29.33	30.02	27.67	26.12	27.02	25.08
3	29.20	32.17	28.20	26.07	27.13	25.16	29.37	30.39	27.91	25.07	27.12	25.31
Mean ± SD	29.34 ± 0.13	31.66 ± 0.50	28.26 ± 0.18	25.97 ± 0.14	27.13 ± 0.02	25.25 ± 0.08	29.36 ± 0.02	30.53 ± 0.59	27.90 ± 0.23	25.67 ± 0.54	27.10 ± 0.07	25.24 ± 0.14
CV (%)	0.44	1.58	0.65	0.55	0.07	0.32	0.08	1.92	0.81	2.10	0.25	0.54
1	29.02	30.02	32.84	28.93	27.81	Taqman 32.31	28.66	30.06	32.19	28.87	28.15	31.89
2	28.71	30.12	32.91	28.72	27.68	32.14	29.02	30.02	32.84	28.93	27.81	32.31
3	28.45	30.09	32.22	29.12	28.12	31.96	28.75	30.05	32.45	29.33	27.65	32.05
Mean ± SD	28.73 ± 0.29	30.06 ± 0.05	32.66 ± 0.38	28.92 ± 0.20	27.87 ± 0.23	32.14 ± 0.17	28.81 ± 0.13	30.00 ± 0.04	32.49 ± 0.27	29.04 ± 0.20	27.87 ± 0.21	25.25 ± 0.17
CV (%)	0.99	0.17	1.16	0.69	0.81	0.51	0.53	0.06	0.82	0.70	0.75	0.54

Ct: Cycle threshold; SD: Standard deviation; CV: Coefficient of variation



**Table 3.** Performance of qPCR for differential diagnosis of B19V infection in samples from patients with cryptogenic acute liver failure.

Sample ID	Serum			Liver tissue explant		
	Mean Ct $\pm$ SD (B19V-DNA)	Viral load	PCR	Mean Ct $\pm$ SD (B19V-DNA)	Viral load	PCR
ALF001	36.30 $\pm$ 0.153	$8.52 \times 10^3$	-	32.00 $\pm$ 0.072	$1.65 \times 10^5$	+
ALF002	37.27 $\pm$ 0.098	$3.51 \times 10^3$	-	33.45 $\pm$ 0.081	$6.52 \times 10^4$	-
ALF003	36.87 $\pm$ 0.126	$5.78 \times 10^3$	-	33.30 $\pm$ 0.065	$2.56 \times 10^4$	-
ALF004	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF 005	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF 006	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF007	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF008	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF009	ND	ND	-	ND	ND	-
ALF010	ND	ND	-	ND	ND	-

ALF: Acute liver failure patient; Ct: Cycle threshold; ND: Not detected; PCR: Polymerase chain reaction; SD: Standard deviation; +: positive; -: negative

concentrations did not provide a precise quantification, since a wide variation among replicates was observed. Therefore, the limit of quantification (LoQ) of  $10^4$  and  $10^2$  copies/mL for Sybr green and Taqman respectively, were assumed, considering the accurate quantification of all assayed replicas (4/4). In accordance with Burd et al. (2010), the LoD is most often below the linear range of an assay and cannot be higher than the LoQ [42].

Using the internal amplification control gene (RNase P) there were no false negative results of B19V detection and/or quantification in serum or hepatic tissue, demonstrating the accuracy of the results. No cross-reaction was observed by Taqman methodology, when testing other viruses, confirming the specificity of this assay for B19V infection. However, a cross-reaction was observed using the Sybr Green methodology, in a Dengue positive sample (Anti-B19V IgM/IgG negative). The Sybr green methodology, based on binding of fluorescent dye to dsDNA, was expected to be less accurate and specific than the Taqman methodology, due to the absence of probes [43].

Both methodologies of the qPCR evaluated demonstrated optimal repeatability and reproducibility, as the coefficient of variation calculated between replicates tested on the same day and on three different days were below 20%, which were in agreement with acceptance criteria requirements [36].

Overall Taqman qPCR showed better accuracy than Sybr green, since the greatest discrepancies observed were the lower LoD, LoQ, specificity and cross-reaction of the Sybr green assay. Therefore, subsequently, the Taqman assay

performance characteristics for diagnosis of B19V infection among cryptogenic ALF cases was evaluated.

B19V-DNA was detected in 30% (3/10) of the cryptogenic ALF cases, using the Taqman qPCR. A low viremia was detected (mean of  $7.6 \times 10^3$  copies/mL), while in hepatic tissue explant samples a moderate viral load (mean of  $8.5 \times 10^4$  copies/mL) was observed. A high frequency of B19V detection in hepatic tissue of ALF has also been reported in previous studies. Langnas et al. [17], detected B19V-DNA in 66% (4/6) of cryptogenic ALF cases, as well as Karetnyi et al. [23], 56.25% (9/16) and Abe et al. [20], 35.7% (10/28) of cryptogenic ALF. All of these studies detected B19V-DNA in samples of liver tissue explant using conventional PCR. Recently however, Somasekar et al. [44], using metagenomics next-generation sequencing detected B19V-DNA in 0.49% (1/204) of cryptogenic ALF patients. Probably, this lower frequency of B19V detection was due to investigation only in serum samples.

These results associated with anti-B19V IgG detection and absence of anti-B19V IgM in these samples, indicated that the assay was able to detect a persistent B19V infection in the liver of these patients. Persistent B19V infection in liver tissues, especially in those with severe liver disease, has been frequently demonstrated [17,23,45,46]. Recently, our group reported for the first time in Brazil, a B19V infection in a fatal case of ALF, using this present standardized methodology of qPCR [22].

## 5. Conclusions

These results demonstrate the importance of using a sensitive and specific molecular method to clarify the B19V infection in cryptogenic ALF cases; using serum and hepatic tissue explant samples. The assay showed optimal performance characteristics and demonstrates fitness for differential diagnosis and investigation of ALF causes.

## Key issues

- The Real time quantitative PCR can be an efficient and rapid tool to clarify uncommon causes of cryptogenic ALF cases.
- Sybr green and Taqman methodologies were validated and standardized in this study.
- Taqman methodology was more sensitive and specific than Sybr green methodology for the diagnosis of cryptogenic ALF.
- B19V DNA was detected in 30% of cryptogenic ALF cases, using the Taqman qPCR
- B19V could be an agent of ALF

**Table 4.** Evaluation of B19V qPCR inhibition, in Taqman methodology, using human RNase P gene in samples from patients with cryptogenic acute liver failure.

Sample ID	Serum				Liver tissue explant			
	Mean Ct $\pm$ SD (B19V-DNA)	Mean Ct $\pm$ SD (RNase P)	Viral load	PCR	Mean Ct $\pm$ SD (B19V-DNA)	Mean Ct $\pm$ SD (RNase P)	Viral load	PCR
ALF001	36.30 $\pm$ 0.153	32.89 $\pm$ 0.259	$8.52 \times 10^3$	-	32.00 $\pm$ 0.072	20.35 $\pm$ 0.046	$1.65 \times 10^5$	+
ALF002	37.27 $\pm$ 0.098	32.06 $\pm$ 0.063	$3.51 \times 10^3$	-	33.45 $\pm$ 0.081	17.23 $\pm$ 0.019	$6.52 \times 10^4$	-
ALF007	ND	31.14 $\pm$ 0.072	ND	-	ND	16.01 $\pm$ 0.084	ND	-
ALF008	ND	33.61 $\pm$ 0.421	ND	-	ND	21.30 $\pm$ 0.042	ND	-
ALF009	ND	31.12 $\pm$ 3.177	ND	-	ND	22.91 $\pm$ 0.218	ND	-
ALF010	ND	35.22 $\pm$ 0.954	ND	-	ND	25.44 $\pm$ 0.141	ND	-

ALF: Acute liver failure patient; Ct: Cycle threshold; ND: Not detected; PCR: Polymerase chain reaction; SD: Standard deviation; +: positive; -: negative



## Acknowledgments

Thanks to Ph.D. Solange A. Oliveira and Ph.D. Katia L. Azevedo from DIP/HUAP/UFF; Ph.D. Débora R. L. Santos, Ph.D. Yasmine R. Vieira, Msc. Amanda O. Lopes from LADTV/IOC/FIOCRUZ; Ph. D. Silvana A. R. Portes from LVCA/IOC/FIOCRUZ for sending us the samples used in this study. Ph. D. Otacilio C. Moreira from LABIMDOE/IOC/FIOCRUZ for support in qPCR methodology and use of RNase P. We also thankful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES for fellowship awarded and the Fundação Oswaldo Cruz for funding this study.

## Author contributions

Arthur Daniel Rocha Alves, Oswaldo Gonçalves Cruz and Luciane Almeida Amado Leon were involved in the conception and design of this study and in analysis and interpretation of the data. Arthur Daniel Rocha Alves, Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia, Oswaldo Gonçalves Cruz, Marcelo Alves Pinto and Luciane Almeida Amado Leon were involved in the drafting of the paper and the final approval of the version to be published; and that all authors agree to be accountable for all aspects of the work.

## Funding

This manuscript was funded by Fundação Oswaldo Cruz.

## Declaration of interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

## Reviewers Disclosure

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial relationships or otherwise to disclose.

## ORCID

Arthur Daniel Rocha Alves  <http://orcid.org/0000-0002-6371-6482>

## References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (\*) or of considerable interest (\*\*) to readers.

- Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, et al. The family parvoviridae. *Arch Virol*. 2014;159(5):1239–1247.
- Qiu J, Soderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):43–113.
- Arista S, De Grazia S, Di Marco V, et al. Parvovirus B19 and “cryptogenic” chronic hepatitis. *J Hepatol*. 2003;38(3):375–376.
- Beghetti M, Gervaix A, Haenggeli CA, et al. Myocarditis associated with parvovirus B19 infection in two siblings with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Eur J Pediatr*. 2000;159(1–2):135–136.
- Finkel TH, Török TJ, Ferguson PJ, et al. Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotizing vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet*. 1994;343(8908):1255–1258.
- Kerr JR, Barah F, Chiswick ML, et al. Evidence for the role of demyelination, HLA-DR alleles, and cytokines in the pathogenesis of parvovirus B19 meningoencephalitis and its sequelae. *J Neuro Neurosurg Psychiatry*. 2002;73(6):739–746.
- Codes L, Schinoni MI, Freitas LAR, et al. Acute cryptogenic hepatitis: a heterogeneous entity, with possible complications. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(4):293–298.

- Hillingso JG, Jensen IP, Tom-Petersen L. Parvovirus B19 and acute hepatitis in adults. *Lancet*. 1998;351(9107):955–956.
- Díaz F, Collazos J. Hepatic dysfunction due to parvovirus B19 infection. *J Infect Chemother*. 2000;6(1):63–64.
- Ho JK, Tha SPL, Coupland R, et al. Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. *Can J Gastroenterol*. 2005;19(3):161–162.
- Hatakka A, Klein J, He R, et al. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3422–3424.
- Larsen L. Parvovirus B19 acute hepatitis in an immunocompetent adult. *Ugeskr Laeger*. 2011;173(43):2719–2720.
- Sun L, Zhang JC, Jia ZS. Association of parvovirus B19 infection with acute icteric hepatitis in adults. *Scand J Infect Dis*. 2011;43(6–7):547–549.
- Leon LA, Marchevsky RS, Gaspar AMC, et al. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(4):258–266.
- Bihari, C., Rastogi A, Saxena P, et al. Parvovirus b19 associated hepatitis. *Hepat Res Treat*. 2013;2013:472027.

### This article highlights the B19V infection in a range of hepatitis-related diseases

- Mihaly I, Trethon A, Arányi Z, et al. Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011. *Orv Hetil*. 2012;153(49):1948–1957.
- Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, et al. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology*. 1995;22(6):1661–1665.
- Sokal EM, Melchior M, Cornu C, et al. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet*. 1998;352(9142):1739–1741.
- Bernuau J, Durand F, Valla D. Parvovirus B19 infection and fulminant hepatitis. *Lancet*. 1999;353(9154):754–755.
- Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, et al. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci*. 2007;4(2):105–109.
- Sun L, Zhang JC. Acute fulminant hepatitis with bone marrow failure in an adult due to parvovirus B19 infection. *Hepatology*. 2012;55(1):329–330.
- Leon LAA, Alves ADR, Garcia RDCNC, et al. Parvovirus B19 infection in a fatal case of acute liver failure. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(12):e355–e358.

### This article report a fatal case of B19V infection in a Brazilian Cryptogenic acute liver failure patient

- Karetnyi YV, Beck PR, Markin RS, et al. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch Virol*. 1999;144(9):1713–1724.
- Norja P, Hokynar K, Aaltonen L-M, et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(19):7450–7453.
- Corcioli F, Zakrzewska K, Fanci R, et al. Human parvovirus PARV4 DNA in tissues from adult individuals: a comparison with human parvovirus B19 (B19V). *Virology*. 2010;7:272.
- Dwivedi M, Manocha H, Tiwari S, et al. Coinfection of parvovirus b19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):649–650.
- Hsu TC, Chen T-Y, Lin M-C, et al. Human parvovirus B19 infection in patients with chronic hepatitis B or hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20(5):733–738.
- Toan NL, Song LH, Kreamsner PG, et al. Co-infection of human parvovirus B19 in Vietnamese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2006;45(3):361–369.
- Maple PA, Hedman L, Dhanilall P, et al. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):947–956.

30. Yu MY, Alter HJ, Virata-Theimer MLA, et al. Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples. *Transfusion*. 2010;50(8):1712–1721.
31. Durigon EL, Erdman DD, Gary GW, et al. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods*. 1993;44(2–3):155–165.
32. Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, et al. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology*. 2002;301(2):374–380.
33. Kerr JR, Kaushik N, Fear D, et al. Single-nucleotide polymorphisms associated with symptomatic infection and differential human gene expression in healthy seropositive persons each implicate the cytoskeleton, integrin signaling, and oncosuppression in the pathogenesis of human parvovirus B19 infection. *J Infect Dis*. 2005;192(2):276–286.
34. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:550–576.
  - **This article shows the international requirement guidelines to evaluate bioanalytical assays**
35. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–622.
  - **This article demonstrates the information necessary to optimize a new quantitative real-time PCR to infectious diseases**
36. ANVISA, Resolução RE número 897 de 29/ 05/2003. 2003.
37. Tourinho, R.S. Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatitis A and E by real-time PCR. *J Genet Genome Res*. 2015;2(1):1–3.
38. Koppelman MH, Cuypers HTM, Emrich T, et al. Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. *Transfusion*. 2004;44(1):97–103.
39. Knöll A, Louwen F, Kochanowski B, et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Med Virol*. 2002;67(2):259–266.
40. Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, et al. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol*. 2005;75(1):161–169.
41. Molenaar-de Backer MW, de Waal M, Sjerps MC, et al. Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. *Transfusion*. 2016;56(2):440–448.
42. Tholen DW, Linnet K, Kondratovich M, et al. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: approved guideline. C.A.L.S. Institute, Editor. Wayne, Pennsylvania: NCLLS; 2004. 1–39.
43. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014;3(85).
44. Somasekar S, Lee D, Rule J, et al. Viral surveillance in serum samples from patients with acute liver failure by metagenomic next-generation sequencing. *Clin Infect Dis*. 2017;65(9):1477–1485.
45. Naides SJ, Karetnyi YV, Cooling LL, et al. Human parvovirus B19 infection and hepatitis. *Lancet*. 1996;347(9014):1563–1564.
46. Eis-Hübinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, et al. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J Med Virol*. 2001;65(2):395–401.

### 3.2 Avaliação de um método molecular para discriminação de DNA *naked* e associado a virion em amostras clínicas

**Título:** *Evaluation of molecular test for the discrimination of “naked” DNA from infectious Parvovirus B19 particles in serum and bone marrow samples*

**Autores:** Arthur Daniel Rocha Alves, Barbara Barbosa Langella, Mariana Magaldi de Souza Lima, Wagner Luís da Costa Nunes Pimentel Coelho, Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia, Claudete Aparecida Araújo Cardoso, Renato Sergio Marchevsky, Marcelo Alves Pinto, Luciane Almeida Amado.

**Revista:** Publicado no periódico *Viruses* (Fator de impacto = 5.048 e Qualis para Medicina 2 = A2).

**Resumo:** Baixos níveis de DNA do Parvovírus B19 (B19V) podem ser detectados na circulação e em diferentes tipos de tecidos de indivíduos imunocompetentes por meses ou anos. A persistência do B19V-DNA em diferentes tipos de tecidos tem sido associada a várias doenças inflamatórias como cardiomiopatia, artrite reumatóide, hepatite e vasculite. No entanto, essa detecção não implica necessariamente na presença de vírions infecciosos. O objetivo do estudo foi otimizar um teste laboratorial para o diagnóstico diferencial de infecção aguda e não aguda por B19V entre espécimes clínicos distintos. O regime de pré-tratamento padronizado foi aplicado em amostras de dez pacientes (cinco com infecção aguda e cinco com infecção não aguda) e de quatro macacos *cynomolgus* infectados experimentalmente com B19V, acompanhados por 60 dias. A maioria das amostras de soro humano tornou-se negativa após o pré-tratamento; no entanto, em quatro pacientes, apenas cargas virais diminuídas foram observadas, indicando que essas amostras ainda continham vírus infecciosos. Níveis reduzidos de B19V-DNA foram observados em animais a partir do 7º dia pós infecção (dpi). Aproximadamente no 45º dpi, os níveis de B19V-DNA estavam abaixo de  $10^5$  UI/mL após o pré-tratamento com Benzonase®, o que não seria consequência da replicação ativa de B19V. Pode se concluir que um teste laboratorial baseado no pré-tratamento com Benzonase® possibilitou a discriminação de “DNA nu” de B19V-DNA encapsulado em vírions.

Portanto, este teste pode ser utilizado para esclarecer o papel do B19V como agente etiológico associado a manifestações clínicas atípicas.





Article

# Evaluation of Molecular Test for the Discrimination of “Naked” DNA from Infectious Parvovirus B19 Particles in Serum and Bone Marrow Samples

Arthur Daniel Rocha Alves <sup>1</sup>, Barbara Barbosa Langella <sup>1</sup>, Mariana Magaldi de Souza Lima <sup>1</sup>, Wagner Luís da Costa Nunes Pimentel Coelho <sup>1</sup>, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia <sup>2</sup>, Claudete Aparecida Araújo Cardoso <sup>3</sup>, Renato Sergio Marchevsky <sup>4</sup>, Marcelo Alves Pinto <sup>1</sup> and Luciane Almeida Amado <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, CEP 21040-900, Brazil; arthuralves@aluno.fiocruz.br (A.D.R.A.); babi.langella@gmail.com (B.B.L.); mari.magaldi13@gmail.com (M.M.d.S.L.); wagnercoelho@aluno.fiocruz.br (W.L.d.C.N.P.C.); marcelop@ioc.fiocruz.br (M.A.P.)

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, CEP 24210-230, Brazil; ritacubel@id.uff.br

<sup>3</sup> Departamento Materno Infantil, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, CEP 24033-900, Brazil; claudetecardoso@id.uff.br

<sup>4</sup> Vice Diretoria de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, CEP 21040-900, Brazil; march@bio.fiocruz.br

\* Correspondence: l\_amado@ioc.fiocruz.br; Tel.: +55-(21)-2562-1876

**Citation:** Alves, A.D.R.;

Langella, B.B.; Lima, M.M.S.; Coelho, W.L.C.N.P.; Cubel Garcia, R.C.N.;

Cardoso, C.A.A.; Marchevsky, R.S.;

Pinto, M.A.; Amado, L.A. Evaluation

of Molecular Test for the Discrimina-

tion of “Naked” DNA from

Infectious Parvovirus B19 Particles

in Serum and Bone Marrow

Samples. *Viruses* **2022**, *14*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Giorgio Gal-

linella

Received: 11 February 2022

Accepted: 05 April 2022

Published: date

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Low levels of parvovirus B19 (B19V) DNA can be detected in the circulation and in different tissue of immunocompetent individuals for months or years, which has been linked to inflammatory diseases such as cardiomyopathy, rheumatoid arthritis, hepatitis, and vasculitis. However, the detection of B19V DNA does not necessarily imply that infectious virions are present. This study aimed to evaluate the method based on the Benzonase<sup>®</sup> treatment for differentiation between the infectious virions from “naked” DNA in serum and bone marrow (BM) samples to be useful for the B19V routine diagnosis. In addition, we estimated the period of viremia and DNAemia in the sera and bone marrow of nonhuman primates experimentally infected with B19V. Serum samples from ten patients and from four cynomolgus monkeys experimentally infected with B19V followed up for 60 days were used. Most of the human serum samples became negative after pretreatment; however, only decreased viral DNA loads were observed in four patients, indicating that these samples still contained the infectious virus. Reduced B19V DNA levels were observed in animals since 7th dpi. At approximately 45th dpi, B19V DNA levels were below 10<sup>5</sup> IU/mL after Benzonase<sup>®</sup> pretreatment, which was not a consequence of active B19V replication. The test based on Benzonase<sup>®</sup> pretreatment enabled the discrimination of “naked DNA” from B19V DNA encapsidated in virions. Therefore, this test can be used to clarify the role of B19V as an etiological agent associated with atypical clinical manifestations.

**Keywords:** Benzonase<sup>®</sup>; parvovirus B19; acute infection; persistent infection; viral DNA load

## 1. Introduction

Parvovirus B19 (B19V) is a small (23–28 nm in diameter), nonenveloped icosahedral virus containing a single-stranded DNA genome of 5,596 nucleotides [1]. B19V is classified as belonging to the *Parvoviridae* family, *Erythroparvovirus* genus, and *Primate erythroparvovirus 1* species, due to its tropism for erythroid progenitor cells, predominantly in the bone marrow and fetal liver [1,2].

B19V is a common, global pathogen that infects children and adults, and serological studies indicate that over 40–60% of healthy adults have anti-B19V IgG antibodies due to previous exposure [3,4]. B19V is mainly transmitted via the respiratory route. Still, it can also be transmitted vertically from the mother to the fetus via the transfusion of whole blood or pooled blood products or via organ transplantation [3,4].

Viral transmission occurs most often during the viremia period that precedes the clinical presentation [3–5]. Approximately one week after a respiratory infection, a high amount of viral DNA ( $>10^{12}$  IU/mL) can persist for 6 to 7 days in the peripheral blood, saliva and respiratory secretions of acutely infected individuals. The classical slapped-cheek rash associated with erythema infectiosum (also known as the fifth disease) and arthralgia develops 17–18 days after infection, at the time of the appearance of IgM- and IgG-specific antibodies [4,5].

B19V infection is usually acute and self-limited and causes no symptoms in most healthy individuals [6]. However, the virus can also induce transient aplastic crisis in patients with underlying hemolytic anemia [7], persistent anemia in immunocompromised patients and hydrops fetalis and fetal loss in pregnant women [8,9]. The wide range of diseases depends on the hematological and immune status of the host [10].

B19V DNA can be detected at low levels ( $10^4$  IU/mL) in the blood and various tissues (bone marrow, skin, tonsils, liver and heart) of immunocompetent individuals for months or years after acute infection, even when B19V antibodies are present [11–13]. However, whether the detection of viral DNA in the blood and tissues of seropositive and asymptomatic individuals reflects the presence of an infectious virus has not been elucidated. This point is of particular concern since B19V is resistant to most inactivation procedures used in manufacturing blood-derived products and can be transmitted by pooled blood products [11–13]. Furthermore, B19V DNA persistence in these tissues may suggest a causal relationship with some clinical conditions, such as myocarditis, chronic arthropathy and acute liver failure (ALF) [3,13–15].

Recently, Molenaar-de Backer and collaborators [16] presented a method for differentiating between B19V DNA in EDTA-plasma samples resulting from active viral replication and B19V viremia. The method is based on plasma pretreatment with Benzonase® prior to nucleic acid extraction. The authors proposed that the remaining B19V DNA can be released from tissues without active replication, suggesting that the role of B19V in clinical syndromes, such as myocarditis and arthritis, based mainly on the detection of B19V DNA in the blood and tissues without further support by serology, clinical signs or epidemiology should be carefully reconsidered [16].

A case of recurrent B19V DNAemia in a patient with hereditary spherocytosis, which was initially interpreted as viral reactivation, was clarified after confirming the absence of infectious viral particles in the patient's blood. The hypothesis was raised that the second episode of DNAemia represented the mass release of B19V DNA from the bone marrow and was, therefore, not the result of active infection [17].

In a previous study, we investigated the presence of B19V in archived liver tissues from patients undergoing liver transplantation for the management of ALF. B19V DNA and viral replication were detected in matched serum and explanted liver samples from 23% of the patients [14]. However, further studies are required to understand the correct meaning of the detection of B19V DNA in their serum and tissues. In this way, differentiating whether genome detection corresponds to an infectious virus could help to clarify the causal relationship between B19V infection and ALF.

These data demonstrate that a laboratory test to establish the nature of B19V DNA (infectious particle or not) can be a tool to interpret the presence of B19V DNA correctly, which would be valuable for determining a causal relationship between B19V and atypical clinical manifestations. Additionally, this simple test could be further utilized to ensure the safety of blood products for transfusion and transplantation purposes.

Thus, this study aimed to evaluate the method based on the Benzonase® treatment for differentiation between the presence of the infectious virions from “naked” DNA in

serum and bone marrow samples to be applied in the routine diagnosis of the B19V infection. In addition, we estimated the period of viremia and DNAemia in the sera and bone marrow of nonhuman primates experimentally infected with B19V.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biological Samples and Ethical Aspects

The performance of the assay was evaluated, in duplicate, using different samples types that have been stratified into four panels, as follows:

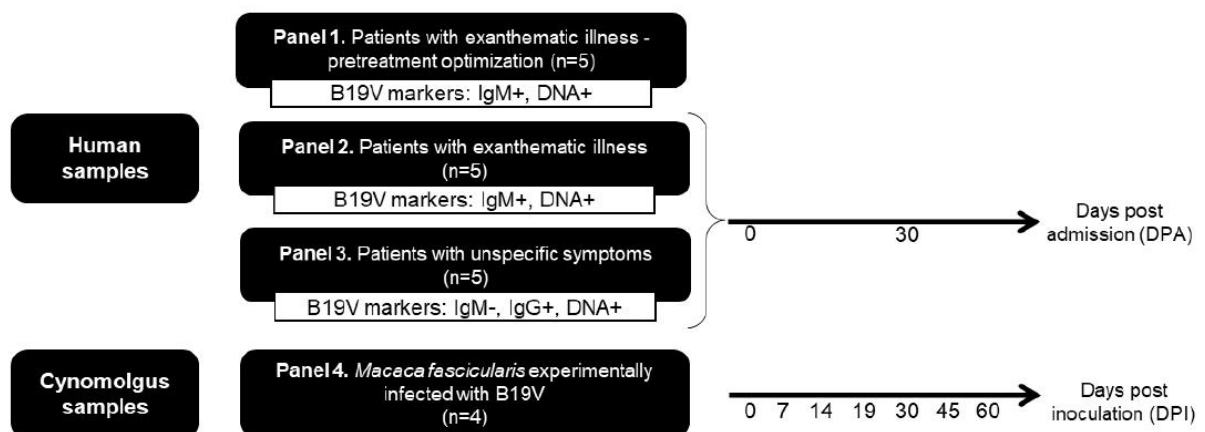
Panel 1. Includes five archived ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) serum samples (encoded as H01 to H05) obtained from patients with exanthematic illness, sent to the LADTV/IOC-Fiocruz for B19V diagnostic evaluation. These samples were characterized as B19V DNA and anti-B19V IgM-positive and were used to establish the optimum concentration of endonuclease in serum treatments.

Panel 2. Ten follow-up serum samples were obtained from five patients with exanthematic illness (encoded as H06 to H10) who tested positive for B19V-DNA and anti-B19V IgM.

Panel 3. Ten follow-up serum samples were obtained from five patients with unspecific symptoms (encoded as H11 to H15) who tested positive for B19V-DNA and anti-B19V IgG and negative for B19V IgM.

Panels 2 and 3 included serum samples from patients monitored for up to 30 days, enrolled at the Hospital Antonio Pedro-Federal Fluminense University and Hospital Getúlio Vargas Filho (Niterói, Brazil). Blood samples from each patient were obtained at the onset of the symptoms during the medical consultation [considered as the 0-day post-admission (dpa)], and a second sample was obtained 30 days later (30 dpa) (Figure 1).

Panel 4. Since the timing of infection of the patients is unsure, we included serial serum and bone marrow samples from four cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), experimentally infected with B19V (encoded as Cy01 to Cy04) to accurately determine the time of infection and correlate it with B19V DNA levels. These animals were clinically healthy, young adults (weighing 3–5 kg), ranging in age from three to four years old from the Department of Primatology, Institute of Science and Technology in Biomodels (Fiocruz), as described by Leon et al. [18]. These samples collected at 7, 14, 19, 30, 45 and 60 days post B19V inoculation (dpi) were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in the LADTV-IOC/Fiocruz biorepository until the beginning of this study [18] (Figure 1).



**Figure 1.** Study population. Serum samples were obtained from patients with B19V markers (IgM, IgG and DNA). Serum and bone marrow (BM) samples were obtained from cynomolgus monkeys experimentally infected with B19V.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (protocol # 1.896.353), all partnering health units, and the Animal Use Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (protocol # P0064-00).

### 2.2. Diagnostic Criteria of B19V Infection

Serum samples were tested, in duplicate, for anti-B19V IgG and anti-B19V IgM by SERION ELISA classic Parvovirus B19 IgG and IgM® (Virion\Serion, Wurzburg, Germany), according to the manufacturer's instructions. These assays have sensitivity and specificity >99% and are composed of virus-like particles (VLPs) containing recombinant VP2 protein to detect B19V IgG and IgM [19]. For anti-B19V IgM detection, a previous dilution of the samples with SERION Rheumatoid Factor-Absorbent (Virion\Serion, Wurzburg, Germany) was made to avoid non-specific ligation of IgM-antibodies (rheumatoid factors), that could lead to false-positive results.

Panels 1 and 2 include serum samples from patients with specific symptoms of B19V infection, anti-B19V IgM and IgG positive, and B19V-DNA positive, indicating a profile of acute infection. On the other hand, panel 3 includes serum samples anti-B19V IgM negative, anti-B19V IgG positive and B19V-DNA positive, indicating a profile of past and persistent infection.

### 2.3. Endonuclease Pretreatment

To investigate whether the B19V DNA detected was encapsidated in viral particles (virions) or not ("naked DNA"), serum and BM samples were pretreated with the Benzonase® enzyme (25 kU; Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). Benzonase® is a genetically engineered endonuclease obtained from *Serratia marcescens* that degrades all forms of genetic material (DNA and RNA) that are free in the sample (i.e., not encapsidated by protein particles in the case of viruses or protected by the lipid bilayer in the case of cells) [16].

The efficiency of Benzonase® to cleave viral nucleic acids present in the serum samples were evaluated as follows. Each serum sample (200 µL) was divided into two 100 µL aliquots. Benzonase® was added to one aliquot, and the other aliquot was not treated with endonuclease as the control sample to compare the effect of the pretreatment.

Both aliquots (Benzonase®-pretreated and the control) were incubated together while shaking at 120 rpm for 1 h at 37°C. Then, the samples were kept at room temperature to stop the reaction, as recommended by the manufacturer and FDA guidelines [20], followed by viral DNA extraction and PCR for the specific detection of B19V DNA. To determine the optimal endonuclease concentration and evaluate its effect on different B19V viral loads, a panel of five serum samples (H01 to H05) with different viral loads ( $10^3$  IU/mL to  $10^7$  IU/mL) were analyzed, in duplicate, with the following concentrations of Benzonase® (25 kU): 0.1 U/µL; 0.5 U/µL; 1.0 U/µL; 1.5 U/µL; 2.0 U/µL; 2.5 U/µL.

Positive and negative virion controls were also included in each experiment. As a positive virion control, a serum (sample H05) from a patient with acute B19V infection (anti-B19V IgM-positive and B19V-DNA of  $10^7$  IU/mL, genotype 1A) was used. As a negative control of virion, a "naked" B19V-DNA (purified from a serum sample) was used. These controls were pretreated with Benzonase® in the same way as the samples and tested with and without pretreatment with an endonuclease.

We used a modified MAPIA (multi-antigen print immunoassay) to evaluate if there were viral particles in serum samples in which the genome titer remained detectable after benzonase pretreatment. This assay consists of a thin layer of immobilized antigen or antibody onto nitrocellulose membrane by micro-printing, without denaturing conditions, followed by a standard chromogenic immunoassay [21]. In this case, mouse IgG anti-B19V VP1 monoclonal (1:1.200) (Abcam Inc., Waltham, MA, USA) was micro-printed to a nitrocellulose membrane using semi-automatic printing equipment (CAMAG automatic TLC sample 4, CAMAG, Muttenz, Switzerland). The membranes were incubated



(37 °C, 30 min) with 1mL of blocker buffer PBS-milk (0.5% skimmed milk (w/v) in PBS). After that, the membrane was washed (3-fold) with PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) and incubated (37 °C, 30 min) with serum, diluted in PBST (1:100), H09 (0 dpa; B19V-DNA negative after benzonase pretreatment) and H10 (0 dpa; B19V-DNA positive after Benzonase® pretreatment). After washing (3-fold, 37 °C, 5 min) with PBST, the membranes were incubated (37 °C, 1 h) with the mouse anti-B19V VP1 monoclonal (1:1.200). After the washing step, the conjugate (Goat IgG anti-mouse with peroxidase; 1:1.200) was added and incubated (37 °C, 30 min). After an additional washing step (3-fold), the immune complex was revealed with diaminobenzidine in citrate/phosphate buffer, pH 5.0, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The membranes were rinsed in purified water at room temperature to stop the reaction. The strips were dried to be analyzed.

#### 2.4. B19V DNA Extraction and qPCR

B19V DNA was extracted from all samples, including the nuclease-treated and non-treated aliquots and the positive and negative controls, using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted with 200 µL of elution buffer and stored at -70 °C until use.

Real-time PCR (qPCR) was carried out using the TaqMan system (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) as described previously [22]. For absolute quantification, a synthetic standard curve of the B19V NS1 region [custom synthesized by IDT® (Coralville, IA)] was designed (nt 1905–1987, GenBank: NC\_000883.2). Primers for the NS1 region (nt 1905F and 1987R) and a single labeled 5' FAM probe (nt 1925–1948, GenBank: NC\_000883.2) were used.

#### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8.3.1. software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Continuous variables were expressed as mean and were compared with the Mann-Whitney U test. All *p*-values were two-sided, and those <0.05 were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Determination of the Optimal Benzonase® Concentration

Serum samples (H01-H05) from five patients with acute B19V infection were pre-treated with Benzonase®, and viral DNA was then extracted from these samples and subjected to qPCR analysis.

As shown in Table 1 and Figure 2, the amount of B19V DNA in samples containing 10<sup>5</sup> IU/mL (H01 and H04) was not significantly reduced after Benzonase® pretreatment at concentrations varying from 0.1 to 2.0 U/µL, indicating the presence of infectious virions. However, the viral DNA load exhibited at least one log<sub>10</sub> reduction in the other three samples (H02, H03 and H05) containing 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> IU/mL after treatment with 2.0 U/µL Benzonase®. The viral DNA loads remained almost the same, using a higher concentration of Benzonase (2.5 U/µL). Thus, we established a concentration of 2.0 U/µL to test the clinical samples.

Table 1. Optimization of Benzonase® concentration among human serum samples.

ID	Nontreated (Mean ± SD)	Serum (IU/mL)					DNA <sup>a</sup> (IU/mL)			
		0.1 (Mean ± SD)	0.5 (Mean ± SD)	1.0 (Mean ± SD)	1.5 (Mean ± SD)	2.0 (Mean ± SD)	2.5 (Mean ± SD)	0.1 (Mean ± SD)	0.5 (Mean ± SD)	1.0 (Mean ± SD)
H01	3.5 × 10 <sup>5</sup> ± 3.3 × 10 <sup>5</sup>	2.1 × 10 <sup>5</sup> ± 2.0 × 10 <sup>5</sup>	1.9 × 10 <sup>5</sup> ± 1.9 × 10 <sup>5</sup>	1.5 × 10 <sup>5</sup> ± 1.5 × 10 <sup>5</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup> ± 1.4 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup> ± 1.4 × 10 <sup>5</sup>	NT	9.4 × 10 <sup>3</sup> ± 8.8 × 10 <sup>3</sup>	Negative	Negative
H02	6.6 × 10 <sup>6</sup> ± 5.7 × 10 <sup>6</sup>	4.6 × 10 <sup>5</sup> ± 3.8 × 10 <sup>5</sup>	3.4 × 10 <sup>5</sup> ± 2.7 × 10 <sup>5</sup>	2.4 × 10 <sup>5</sup> ± 1.9 × 10 <sup>5</sup>	5.6 × 10 <sup>4</sup> ± 6.2 × 10 <sup>4</sup>	3.9 × 10 <sup>4</sup> ± 3.4 × 10 <sup>4</sup>	NT	6.1 × 10 <sup>3</sup> ± 2.1 × 10 <sup>3</sup>	Negative	Negative
H03	2.2 × 10 <sup>6</sup> ± 2.0 × 10 <sup>6</sup>	4.9 × 10 <sup>5</sup> ± 8.9 × 10 <sup>4</sup>	4.8 × 10 <sup>5</sup> ± 3.6 × 10 <sup>5</sup>	8.9 × 10 <sup>5</sup> ± 7.7 × 10 <sup>5</sup>	6.4 × 10 <sup>5</sup> ± 4.8 × 10 <sup>5</sup>	3.3 × 10 <sup>5</sup> ± 2.1 × 10 <sup>5</sup>	NT	5.1 × 10 <sup>4</sup> ± 6.4 × 10 <sup>3</sup>	3.4 × 10 <sup>3</sup> ± 3.2 × 10 <sup>3</sup>	Negative
H04	8.6 × 10 <sup>5</sup> ± 8.4 × 10 <sup>5</sup>	5.8 × 10 <sup>5</sup> ± 6.5 × 10 <sup>5</sup>	5.4 × 10 <sup>5</sup> ± 6.1 × 10 <sup>5</sup>	4.9 × 10 <sup>5</sup> ± 5.7 × 10 <sup>5</sup>	4.7 × 10 <sup>5</sup> ± 5.2 × 10 <sup>5</sup>	3.8 × 10 <sup>5</sup> ± 4.3 × 10 <sup>5</sup>	2.1 × 10 <sup>5</sup> ± 4.8 × 10 <sup>4</sup>	5.6 × 10 <sup>4</sup> ± 3.4 × 10 <sup>4</sup>	5.2 × 10 <sup>3</sup> ± 2.6 × 10 <sup>3</sup>	Negative
H05	1.3 × 10 <sup>7</sup> ± 1.7 × 10 <sup>7</sup>	5.4 × 10 <sup>6</sup> ± 6.7 × 10 <sup>6</sup>	5.6 × 10 <sup>5</sup> ± 5.9 × 10 <sup>5</sup>	5.4 × 10 <sup>5</sup> ± 6.0 × 10 <sup>5</sup>	5.2 × 10 <sup>5</sup> ± 6.2 × 10 <sup>5</sup>	1.5 × 10 <sup>5</sup> ± 3.1 × 10 <sup>4</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup> ± 1.0 × 10 <sup>4</sup>	4.9 × 10 <sup>4</sup> ± 2.9 × 10 <sup>4</sup>	3.1 × 10 <sup>4</sup> ± 1.8 × 10 <sup>4</sup>	Negative

ID: Identification; IU/mL: International Units per milliliter; SD: standard deviation; NT: Non-tested due to insufficient sample volume. <sup>a</sup> Extracted DNA was also treated with Benzonase® to become a negative control and to check the standardized Benzonase® concentration.

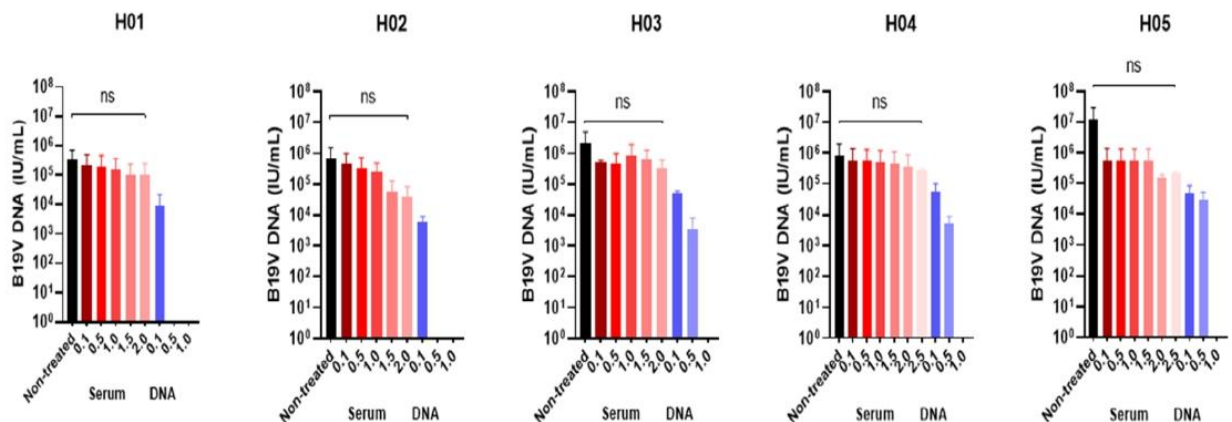


Figure 2. Optimization of Benzonase® concentration among human serum samples. IU/mL: International Units per milliliter. Ns: non-significant.

The effect of Benzonase® pretreatment (1.0 U/μL) on the load of the “naked” DNA controls reduced the genome copy numbers to undetectable levels, signifying that the samples comprised naked DNA.

The positive control (sample H05) was positive in all experiments, so there were viruses in this sample. On the other hand, the negative control, which consists of the DNA from the serum sample treated with Benzonase®, was negative in all experiments.

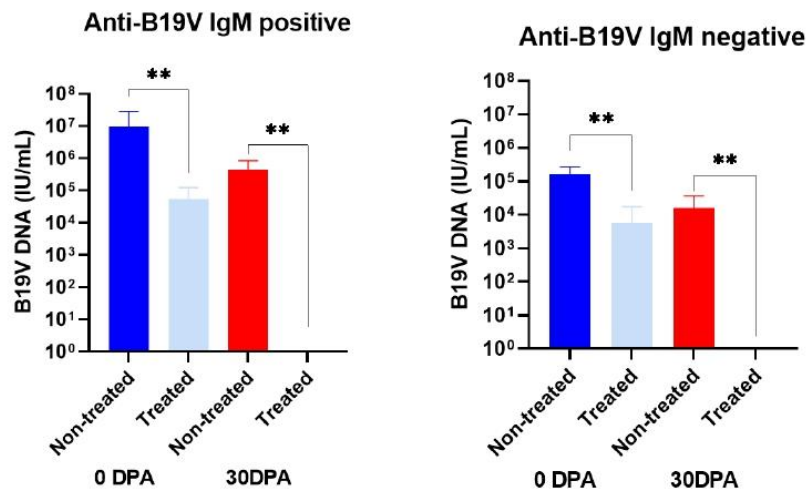
### 3.2. Effect of Benzonase® Pretreatment on the B19V DNA Levels in Serum Samples from Infected Patients

Serial serum samples were obtained from ten patients that were B19V DNA positive. Among them, five patients had a profile of B19V acute infection (H06-H10; average age of 10 years, ranging from 3 to 39 years), and five had a profile of B19V persistent infection (H11-H15; average age of 9 years, ranging from 6 to 28 years). All sera collected from anti-B19V IgM positive individuals, 30 days post-admission (30 dpa), remained positive for B19V DNA. In contrast, second samples from most of the individuals' anti-B19V IgM negative (3/5) became negative for B19V DNA (Table 2 and Figure 3).

**Table 2.** Performance of Benzonase® pretreatment among human sera samples from patients B19V DNA positive, according to anti-B19V IgM presence.

	ID	Sera Collected at 0 dpa			Sera Collected at 30 dpa		
		B19V Load (IU/mL) (Mean ± SD)	B19V Load Treated (IU/mL) (Mean ± SD)	p-Value	B19V Load (IU/mL) (Mean ± SD)	B19V Load Treated (IU/mL) (Mean ± SD)	p-Value
Anti-B19V IgM positive	H06	$9.3 \times 10^5 \pm 8.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$	<0.01	$1.7 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$	Negative	<0.01
	H07	$4.3 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^7$	$6.4 \times 10^4 \pm 4.1 \times 10^4$		$2.1 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$	Negative	
	H08	$1.9 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$		$9.0 \times 10^5 \pm 7.8 \times 10^5$	Negative	
	H09	$1.7 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$	Negative		$8.4 \times 10^5 \pm 8.2 \times 10^5$	Negative	
	H10	$2.3 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$		$2.2 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$	Negative	
Anti-B19V IgM negative	H11	$1.9 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^5$	Negative	<0.01	Negative	Negative	<0.01
	H12	$1.8 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$		$3.7 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^4$	Negative	
	H13	$3.3 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$		Negative	Negative	
	H14	$4.6 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^4$	Negative		Negative	Negative	
	H15	$5.7 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^4$	Negative		$4.0 \times 10^4 \pm 3.9 \times 10^4$	Negative	

D: Identification; B19V: Parvovirus B19; IU/mL: International Units per milliliter; dpa: days post-admission; SD: standard deviation.

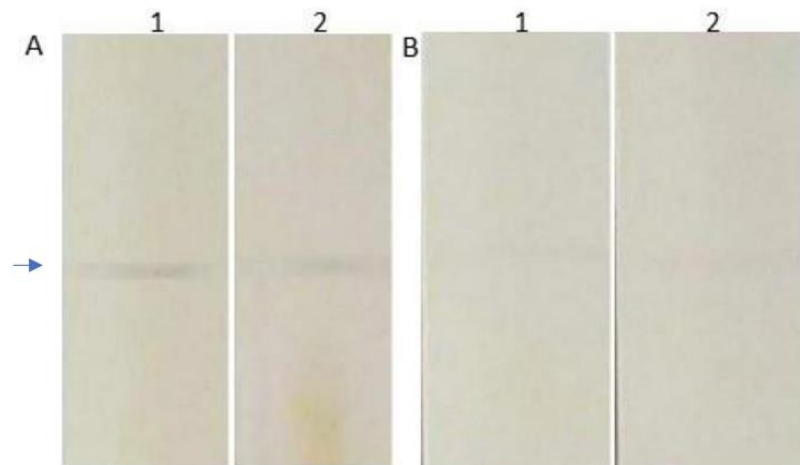


**Figure 3.** Performance of Benzonase® pretreatment in serial serum samples collected from patients with anti-B19V IgM positive and negative. IU/mL: International Units per milliliter; DPA: Days post-admission; \*\* p-value < 0.01

After pretreatment with endonuclease (2.0 U/μL), in most of the samples anti-B19V IgM positive (H06, H07, H08 and H10), the B19 DNA remained detectable, despite the DNA load being partially reduced after pretreatment, suggesting that part of the B19V DNA in these samples was encapsidated in viral particles (Table 2). On the other hand, among patients without anti-B19V IgM, three (H11, H14 and H15) became undetectable, which is compatible with a nonencapsidated state of B19V DNA. However, all the samples collected 30 days after admission were 100% sensitive to endonuclease, confirming the presence of “naked” DNA.

In both groups (anti-B19V IgM positive and negative), the differences in the viral load before and after endonuclease pretreatment were statistically significant in samples collected at 0 and 30 dpa ( $p < 0.05$ ).

The presence of encapsidated B19V DNA in a serum sample (H10) in which the B19V DNA remained detectable after pretreatment with Benzonase® was proven by MAPIA (Figure 4A). The immune complex of anti-B19V/ B19V VP1-VP2 confirmed the occurrence of B19V particles in this sample. In contrast, Figure 4B shows the absence of B19V particles in a serum sample (H09) in which B19V DNA became undetectable after pretreatment with Benzonase®.



**Figure 4.** Evaluation of B19V particles' presence in serum samples by MAPIA. In this assay, the immunocomplex of mouse anti-B19V monoclonal antibody/ B19V VP1-VP2 capsid proteins was revealed by goat IgG anti-mouse-peroxidase (arrow). (A) Serum sample (H10) with B19V DNA detectable before (1) and after benzonase pretreatment (2). (B) Serum sample (H09) with B19V DNA undetectable before (1) and after benzonase pretreatment (2).

### 3.3. Evaluation of B19V DNA in Serum and Bone Marrow Samples from Experimentally Infected *Cynomolgus* Monkeys

As shown in Figure 5, a correlation between the appearance of anti-B19V IgG in serum and the sensitivity of viral DNA in serum and bone marrow to Benzonase® treatment was observed.



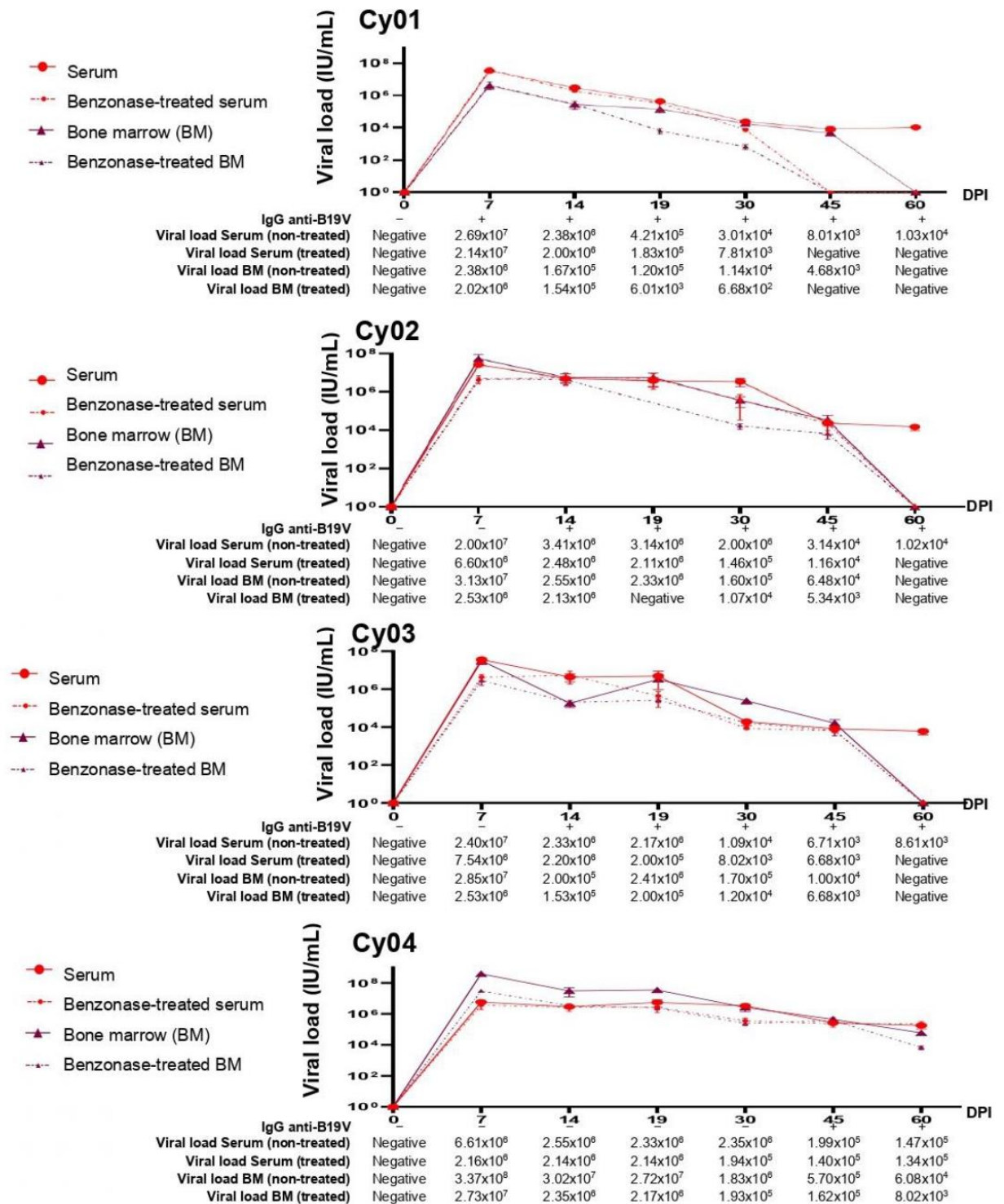


Figure 5. Follow-up of anti-B19V IgG and B19V DNA levels during the experimental infection in cynomolgus monkeys (n = 4). IU/mL: International Units per milliliter; BM: Bone marrow; -: Negative; +: Positive; DPI: Days-post infection; <sup>a</sup> Not tested due to insufficient bone marrow sample.

In the Cy01, which showed early seroconversion of IgG at the 7th dpi, B19V DNA remained detectable until the 30th dpi after benzonase® treatment. While, Cy02 and Cy03, in which seroconversions were detected at the 14th dpi, B19V DNA remained detectable until the 45th dpi, indicating a longer presence of encapsidated B19V DNA in these animals with later seroconversion, than that observed in Cy01 (Figure 5).

From 30th dpi, a reduction in viral loads was seen in serum and bone marrow samples after Benzonase® treatment compared with nontreated samples, indicating that “naked” and encapsidated B19V DNA coexist until the 60th dpi. At this point, the DNA from the infectious virions was no longer detectable. For Cy04, as seroconversion occurred only at the 45th dpi, B19V DNA remained detectable after endonuclease treatment, demonstrating the longest presence of infectious virions.

The difference between the treated and nontreated serum samples was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In this study, we evaluated the performance of a method based on sample pretreatment with Benzonase® followed by qPCR to detect and quantify B19V infectious viral particles (virions) in serum and in bone marrow. It has been reported that viral DNA can be diagnosed in peripheral blood several days or months after the acute infection [23–25]. To understand the clinical significance of long-term B19V DNA detection, reliable methods are needed to confirm the virions in tissues from these patients and their association with the B19V clinical course, as suggested by other researchers in the context of autoimmune thyroid gland diseases [26], the skin without dermatological injury [27], and myocardial inflammatory injury [28].

Serial samples from naturally B19V-infected individuals and experimentally infected cynomolgus monkeys demonstrated that the presence of B19V DNA in the blood did not necessarily correlate with the presence of infectious viral particles (virions) circulating. This finding is in accordance with a previous study that revealed the presence of virions only at the beginning (approximately 60 days) of the infection. Molenaar-de-Backer and collaborators determined that after five months, only naked-strands B19V DNA was found [16].

The ideal concentration of Benzonase® for use in serum and BM samples was determined. An optimal Benzonase® concentration of 2.0 U/μL was adopted since, using a higher concentration of Benzonase® (2.5 U/μL), the viral loads remained the same. All serum samples from patients with and without anti-B19V IgM showed partially or completely reduced viral loads after Benzonase® pretreatment, which suggested the cooccurrence of viremia and DNAemia in both groups of patients on the first collection day. Most of the patients with a profile of acute infection (H06, H07, H08, H10) remained with the viral DNA detectable, showing a partial reduction of the genome titer, which suggests that during the acute phase of infection, the DNA is predominantly encapsidated. The MAPIA showed that the detection of viral DNA in these samples, even after endonuclease treatment, could be ascribed to the presence of the encapsidated viral DNA.

The viral DNA from three patients with a profile of acute infection (H09) became undetectable after endonuclease treatment on the first collection day. This result suggests that probably this patient was in an advanced period of infection and no longer in an acute infection. This indicates that the Benzonase® pretreatment assay must be used as an additional approach to attest the status of infection. Although IgM, in general, is a sensitive indicator of recent infection, it lacks clinical specificity in many contexts. Furthermore, anti-B19V IgM can remain detectable for approximately 30 days post-infection [29], or it can, in the acute phase, be of very low titer and thus remain below the threshold of detection in a low-sensitive IgM ELISA. Lastly, it can pick up non-specific IgM [30]. Approximately 30 days after the first collection, all samples were negative for B19V DNA after Benzonase® pretreatment, demonstrating that there was only ‘naked’ B19V DNA. These samples collected approximately 30 days after infection showed viral loads between  $10^3$ -

$10^5$  IU/mL, which suggested that samples with a viral load  $\leq 10^4$  IU/mL do not contain infectious virus, as suggested by other groups, European Pharmacopoeia and Food and Drug Administration [29,31,32].

The 60-day follow-up of experimentally infected cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) revealed high B19V viremia in most animals even after seroconversion. The results observed in patients and animals were similar, as the endonuclease pretreatment experiments demonstrated that during the first 30 days of B19V infection, the presence of B19V DNA was indicative of infectious virus. Subsequently, B19V DNA was degraded by the endonuclease, indicating that “naked DNA” was predominantly present. B19V “naked DNA” was generally diagnosed under the viral load of  $10^5$  IU/mL, indicating that samples with this viral load are not potentially infectious.

These results are of great relevance for blood banks, considering that the detection of B19V DNA in blood donor samples with a viral load  $\leq 10^4$  IU/mL does not pose a residual risk for blood transfusion transmission [33,34] since these blood donors with low viremia, no longer have B19V virions.

In the persistent infection, there is a lower viral genome expression, possibly contributing to the maintenance of the virus in tissues, that can be relevant to the balance and outcome of the different types of infection associated with B19V [35]. It has been proposed that the persistence of B19V DNA in blood, also known as DNAemia, can result from B19V DNA released from apoptotic or necrotic cells [36,37]. The passive release of viral DNA may likely explain the genome present in the blood in some cases, while in other cases, active viral infection is responsible. Therefore, B19V DNA present in the blood approximately 45 days after acute infection probably derives from a different origin, but it remains unknown hitherto.

B19V infects erythrocyte progenitors binding to the cellular receptor globoside (or P antigen), which induces structural changes in the capsid, leading to the accessibility of the N-terminal region of VP1 (VP1u) that is required for internalization [38]. However, this internalization in cell types that are not permissive to infection does not appear to start a productive infection cycle, leading to an accumulation of B19V DNA [38]. This was confirmed by the presence of B19V DNA in many tissues that are not permissive to the virus [13]. Naked DNA can be released into the circulation by apoptosis or necrosis or when cells are normally renewed and via exocytosis. This release by cells can occur for years or even decades after the initial B19V infection, depending on cell type. Since different cell types have different turnover rates, this can cause an aleatory release of B19V DNA, explaining the gradual decline in viremia after acute infection. [16].

Conventional and real-time molecular assays can detect low quantities of viral DNA because they are extremely sensitive techniques. However, they do not differentiate between infectious virus particles and “naked DNA.” Therefore, the treatment method with an endonuclease that cleaves any DNA or RNA present in a sample is quite useful in determining whether B19V DNA is infectious and linked to replication [16].

The availability of a simple and reliable method to distinguish viral particles from naked genetic material could be especially applicable for non-cultivable viruses, such as B19V, whose productive infection is highly restricted to erythroid progenitor cells of the bone marrow [4], and for viruses whose isolation procedure requires a high biosafety level, such as SARS-CoV-2. Other future applications of this test include the correct diagnoses of several viral infections, as prolonged periods of viremia have been increasingly observed with the development of highly sensitive molecular techniques for viral genome detection and the detection of viral genomes spread in multiple organs of infected patients. Establishing the relevance of viremia in these cases and the causal relationship of this finding with infection is of paramount importance for the correct laboratory diagnoses of viral infections.

The small human ( $n = 10$ ) and monkey ( $n = 4$ ) sample sizes and the differential periods of observation for the collected samples (30 days for humans and 60 days for monkeys) could be considered limitations of this study.



## 5. Conclusions

The laboratory test based on Benzonase® pretreatment of serum and BM samples enabled the discrimination of “naked DNA” from B19V infectious particles in these clinical specimens. Therefore, this test can be a valuable tool to be used in routine diagnosis to clarify the role of B19V as an etiological agent associated with atypical clinical manifestations and an additional approach to attest the timing of the infection.

**Author Contributions:** A.D.R.A. and L.A.A. were involved in the conception and design of this study and in the analysis and interpretation of the data. A.D.R.A., B.B.L., M.M.d.S.L. and W.L.d.C.N.P.C. were involved in performing the tests. All authors were involved in the drafting of the paper and agreed to be accountable for all aspects of the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel–CAPES for the fellowship awarded; MS/Inova Fiocruz – Geração de conhecimento (number: 1825330), FAPERJ-JCNE (number: e-26/201.406/2021) and the Oswaldo Cruz Institute for funding this study.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (protocol # 1.896.353), by all partnering health units and by the Animal Use Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (protocol # P0064-00).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cotmore, S.F.; Agbandje-McKenna, M.; Canuti, M.; Chiorini, J.A.; Eis-Hubinger, A.M.; Hughes, J.; Mietzsch, M.; Modha, S.; Ogliaastro, M.; Pénzes, J.J.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 367–368.
2. Bua, G.; Manaresi, E.; Bonvicini, F.; Gallinella, G. Parvovirus B19 Replication and Expression in Differentiating Erythroid Progenitor Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148547.
3. Heegaard, E.D.; Brown, K.E. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 485–505.
4. Qiu, J.; Söderlund-Venermo, M.; Young, N.S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 43–113.
5. Anderson, M.J.; Higgins, P.G.; Davis, L.R.; Willman, J.S.; Jones, S.E.; Kidd, I.M.; Pattison, J.R.; Tyrrell, D.A.J. Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis.* **1985**, *152*, 257–265.
6. Woolf, A.D.; Champion, G.V.; Chishick, A.; Wise, S.; Cohen, B.J.; Klouda, P.T.; Caul, O.; Dieppe, P.A. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* **1989**, *149*, 1153–1156.
7. Pattison, J.R. The pathogenesis of diseases associated with B19 virus. *Behring Inst. Mitt.* **1990**, *85*, 55–59.
8. Brown, K.E.; Green, S.W.; Antunez de Mayolo, J.; Young, N.S.; Bellanti, J.A.; Smith, S.D.; Smith, T.J. Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet* **1994**, *343*, 895–896.
9. White, F.V.; Jordan, J.; Dickman, P.S.; Knisely, A.S. Fetal parvovirus B19 infection and liver disease of antenatal onset in an infant with Ebstein’s anomaly. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* **1995**, *15*, 121–129.
10. Young, N.S.; Brown, K.E. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 586–597.
11. Cassinotti, P.; Siegl, G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *19*, 886–887.
12. Norja, P.; Hokynar, K.; Aaltonen, L.M.; Chen, R.; Ranki, A.; Partio, E.K.; Kiviluoto, O.; Davidkin, I.; Leivo, T.; Eis-Hübinger, A.M.; et al. Bioportfolio: Lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7450–7453.
13. Adamson-Small, L.A.; Ignatovich, I.V.; Laemmerhirt, M.G.; Hobbs, J.A. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: Possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* **2014**, *190*, 8–16.
14. Alves, A.D.; Melgaço, J.G.; Cássia Nc Garcia, R.; Raposo, J.V.; de Paula, V.S.; Araújo, C.C.; Pinto, M.A.; Amado, L.A. Persistence of Parvovirus B19 in liver from transplanted patients with acute liver failure. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 307–317.
15. Söderlund, M.; von Essen, R.; Haapasaari, J.; Kiistala, U.; Kiviluoto, O.; Hedman, K. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* **1997**, *349*, 1063–1065.
16. Molenaar-de Backer, M.W.; Russcher, A.; Kroes, A.C.; Koppelman, M.H.; Lanfermeijer, M.; Zaaijer, H.L. Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J. Clin. Virol.* **2016**, *84*, 19–23.
17. Reber, U.; Moser, O.; Dilloo, D.; Eis-Hubinger, A.M. On the utility of the benzonase treatment for correct laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* **2017**, *95*, 10–11.



18. Leon, L.A.; Marchevsky, R.S.; Gaspar, A.M.; Garcia Rde, C.; Almeida, A.J.; Pelajo-Machado, M.; De Castro, T.X.; Nascimento, J.P.D.; E Brown, K.; Pinto, M.A. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: No evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 258–266.
19. Virion\Serion. SERION ELISA Classic Parvovirus B19 IgG/IgM 2022. Available online: <https://www.serion-diagnostics.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=5684&token=7c18512b5138b8f2e5dec0a78e0f8d4edc94ccd4> (accessed on 30 June 2021).
20. Guidance for Industry, Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research [February 2010]. Available online: <https://www.fda.gov/media/78428/download> (accessed on 7 april 2022).
21. Lyashchenko, K.P.; Singh, M.; Colangeli, R.; Gennaro, M.L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods* **2000**, *242*, 91–100. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00241-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00241-6).
22. Alves, A.D.R.; Cubel Garcia, R.d.C.N.; Cruz, O.G.; Pinto, M.A.; Amado Leon, L.A. Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2019**, *19*, 259–266.
23. Juhl, D.; Görg, S.; Hennig, H. Persistence of Parvovirus B19 (B19V) DNA and humoral immune response in B19V-infected blood donors. *Vox Sang.* **2014**, *107*, 226–232.
24. Kerr, J.R.; Curran, M.D.; Moore, J.E.; Coyle, P.V.; Ferguson, W.P. Persistent parvovirus B19 infection. *Lancet* **1995**, *345*, 1118.
25. Musiani, M.; Zerbini, M.; Gentilomi, G.; Plazzi, M.; Gallinella, G.; Venturoli, S. Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J. Infect. Dis.* **1995**, *172*, 1360–1363.
26. Gravelšina, S.; Nora-Krukke, Z.; Svirskis, S.; Cunskis, E.; Murovska, M. Presence of B19V in Patients with Thyroid Gland Disorders. *Medicina* **2019**, *55*, 774.
27. Santonja, C.; Santos-Briz, A.; Palmedo, G.; Kutzner, H.; Requena, L. Detection of human parvovirus B19 DNA in 22% of 1815 cutaneous biopsies of a wide variety of dermatological conditions suggests viral persistence after primary infection and casts doubts on its pathogenic significance. *Br. J. Dermatol.* **2017**, *177*, 1060–1065.
28. Van Linthout, S.; Elsanhoury, A.; Klein, O.; Sosnowski, M.; Miteva, K.; Lassner, D.; Abou-El-Enein, M.; Pieske, B.; Kühl, U.; Tschöpe, C. Telbivudine in chronic lymphocytic myocarditis and human parvovirus B19 transcriptional activity. *ESC Heart Fail.* **2018**, *5*, 818–829.
29. Maple, P.A.; Hedman, L.; Dhanilall, P.; Kantola, K.; Nurmi, V.; Söderlund-Venermo, M.; Brown, K.E.; Hedman, K. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: A dual-laboratory study. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 947–956.
30. 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*, 115–120.
31. European Pharmacopoeia (Ph.Eur.); *B19 VIRUS DNA for NAT testing BRP (Y0000285)*; Strasbourg Cedex, France, 2019; p. 3.
32. Food and Drug Administration (FDA); *Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of Human Parvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products (HFM-40)*; Silver Spring, MD, USA, 2009; p. 7.
33. Lefrère, J.J.; Maniez-Montreuil, M.; Morel, P.; Defer, C.; Laperche, S. Safety of blood products and B19 parvovirus. *Transfus. Clin. Biol.* **2006**, *13*, 235–241.
34. 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*, 2890–2895.
35. 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*, e33316.
36. Corcioli, F.; Zakrzewska, K.; Rinieri, A.; Fanci, R.; Innocenti, M.; Civinini, R.; De Giorgi, V.; Di Lollo, S.; Azzi, A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 2005–2011.
37. Schenk, T.; Enders, M.; Pollak, S.; Hahn, R.; Huzly, D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 106–110.
38. Ganaie, S.S.; Qiu, J. Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 166.

### 3.3 Diagnóstico diferencial de parvovirus B19 em pacientes com falência hepática aguda

**Título:** *Persistence of parvovirus B19 in liver from transplanted patients with acute liver failure*

**Autores:** Arthur Daniel Rocha Alves, Juliana Gil Melgaço, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Jéssica Vasques Raposo, Vanessa Salete de Paula, Cristina Carvalho Viana Araújo, Marcelo Alves Pinto, Luciane Almeida Amado.


**Revista:** Publicado no periódico *Future Microbiology* (Fator de impacto = 3.165 e Qualis para Medicina 2 = A2).

**Resumo:** No presente estudo foi investigada a presença de Parvovírus humano B19 (B19V) em tecidos de pacientes com falência hepática aguda (FHA) e avaliada a atividade viral no fígado infectado. Amostras de soro e fígado de 30 pacientes submetidos ao transplante hepático devido a FHA foram investigadas para a infecção por B19V por meio de PCR em tempo real, testes sorológicos e avaliação de expressão de RNAm do B19V (transcritos) no fígado. As amostras de soro e fígado de 7 pacientes foram positivas para a presença do B19V-DNA (carga viral de  $10^3$ - $10^5$  cópias/mL). Em sua maioria apresentaram IgG anti-B19V, indicando uma infecção persistente. RNAm do B19V foi detectado em todos os pacientes, demonstrando replicação intra-hepática. A infecção do fígado por B19V durante o curso de FHA não A-E sugeriu um papel do B19V no dano hepático, que produziu um pior resultado em pacientes coinfectados e em pacientes com FHA sem etiologia definida.

Short Communication

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)Future  
MICROBIOLOGY

## Persistence of Parvovirus B19 in liver from transplanted patients with acute liver failure

Arthur DR Alves<sup>\*,1</sup> , Juliana G Melgaço<sup>1</sup>, Rita de Cássia NC Garcia<sup>2</sup>, Jessica V Raposo<sup>3</sup>, Vanessa S de Paula<sup>3</sup>, Cristina CV Araújo<sup>4</sup>, Marcelo A Pinto<sup>1</sup> & Luciane A Amado<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil<sup>3</sup>Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil<sup>4</sup>Hospital Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ, Brasil\*Author for correspondence: Tel.: +55(21) 2562 1900; [arthur.alves@ioc.fiocruz.br](mailto:arthur.alves@ioc.fiocruz.br)

**Aim:** In this study, we investigated the presence of B19V in liver tissues from patients with acute liver failure (ALF) and evaluated the viral activity in infected liver. **Methods:** Serum and liver samples from 30 patients who underwent liver transplantation for ALF were investigated for B19V infection by real-time PCR, serological tests and examination of B19V mRNA (transcript) expression in the liver. **Results:** The serum and liver samples from seven patients were B19V DNA positive ( $10^3$ – $10^5$  copies/ml). Most of them presented detectable anti-B19V IgG, indicating persistent infection. B19V mRNA was detected in all patients, demonstrating intra-hepatic replication. **Conclusion:** B19V infection of the liver during the course of non-A-E ALF suggested a role of B19V, which produced the worst outcome in co-infected patients and in patients with cryptogenic ALF, in liver damage.

First draft submitted: 26 July 2019; Accepted for publication: 17 February 2020; Published online: 14 April 2020

**Keywords:** acute liver failure • diagnostic • Parvovirus B19 • liver disease • real-time PCR

Acute liver failure (ALF) is a rare syndrome characterized by liver dysfunction in patients without pre-existing liver disease or cirrhosis for the last 2 months [1]. The clinical presentation of ALF may be fast and progressive with the massive loss of healthy hepatocytes, jaundice, coagulopathy (international normalized ratio [INR] >1.5) and signs of hepatic encephalopathy [2].

This increasingly recognized disease has significant morbidity and mortality as well as a variety of manifestations and etiologies [3]. There are important differences between ALF etiology in developing and developed countries [2,4]. Currently, in the USA and Europe, the most common causes of ALF are drug-induced liver injury and autoimmune hepatitis, whereas in developing countries (i.e., Brazil), cases of viral hepatitis represent an important fraction of all ALF cases. In many instances (so-called 'non-A-E', 'indeterminate' or 'cryptogenic' hepatitis), the etiology remains unclear [5,6]. In general, the etiological agent is unknown in 50% of pediatric and 15% of adult ALF patients [7].

According to previous studies, the outcome of ALF patients depends on the etiology [3,5,7]. Spontaneous survival has been reported in approximately 60% of ALF cases induced by acetaminophen, hepatitis A and ischemia. On the other hand, among hepatitis B and cryptogenic ALF cases, the spontaneous survival rate can be low (25%) [7].

Parvovirus B19 (B19V) has been recognized as a self-limiting cause of acute hepatitis and an uncommon cause of liver disorders [8–19]. Generally, acute B19V infection causes mild disease associated with erythema infectiosum, transient anemia, rash and arthritis [20]. In contrast, in immunocompromised patients, such as transplanted patients, infection may lead to several diseases, such as chronic pure red blood cell aplasia [21].

B19V-associated acute hepatitis can induce biochemical changes compatible with acute hepatitis and its diagnosis has been performed by seroconversion and detection of B19V DNA in serum and/or liver biopsy specimens [11,12,15,16]. A high prevalence of B19V DNA has been detected in the livers of patients with liver disease, including ALF, and has been associated with post-transplantation liver dysfunction [15]. Therefore, the pathogenic role of B19V in liver injury [8], mainly in the development of acute hepatitis [10–12] and ALF of unexplained

Future  
Medicine



Short Communication Alves, Melgaço, Garcia *et al.*

etiology [13–17] and during co-infection with hepatitis B or C virus, which often worsens outcome [18,19], has been suggested.

Among patients with ALF, B19V DNA is generally detected without a specific acute serological marker (anti-B19V IgM) or viral genome in serum samples, confirming the absence of acute infection. In immunocompetent individuals, B19V DNA has been frequently detected in liver tissues [8,10,13,14] for months and even years, despite the presence of neutralizing antibodies [22], suggesting human B19V persistence in the hepatic compartment [23].

The clinical significance of delayed B19V clearance in patients with low-level B19V viremia is unknown. In this way, considerable attention has been given over the last 2 decades to the frequent detection of B19V DNA in tissues, triggering interest in the role of B19V in liver dysfunction [7,12].

In this study, we investigated the presence of B19V in archived liver tissues from patients undergoing liver transplantation for the management of ALF and evaluated viral activity in these liver explants. The results of this study will be helpful to elucidate the possible role of B19V in this liver pathology.

## Methods

### Study population & ethical aspects

Archived pretransplantation serum samples and liver explants from 30 patients with ALF undergoing liver transplantation were analyzed for B19V infection. The pretransplantation serum samples matched with liver tissue explants of each ALF patient ( $n = 30$ ) at the moment of liver transplant were individually aliquoted. These sera and liver explant samples were stored in the biorepository of LADTV/IOC-Fiocruz. These patients had been admitted to the Hospital Federal de Bonsucesso, a large tertiary referral public hospital for liver transplantation in Rio de Janeiro city, Brazil, between 2004 and 2012. Liver and serum samples from an age-matched control group ( $n = 5$ ) comprising healthy subjects admitted to the Hospital Federal de Bonsucesso as liver donors were analyzed in parallel. All liver biopsies from control group had normal histopathological findings and were negative for viral hepatitis (A–E) by PCR. Liver biopsies are an invasive procedure and the volume of sample obtained is usually not enough to perform all molecular tests, besides the histopathological tests necessary for routine pretransplantation tests. The small numbers of controls ( $n = 5$ ) included in this present study was due the difficulty to obtain the donor consent to perform the biopsy procedure, in addition to the already required pretransplant biopsies for routine tests. The frequency of B19V DNA detection in control group was compared with the reference population (ALF), aiming to evaluate if the frequency observed in the ALF patients was the same of the general population.

ALF cases were defined by evidence of an INR  $\geq 1.5$  and hepatic encephalopathy score above two according to King's College criteria [24].

Patients were carefully screened before transplantation for viral hepatitis (hepatitis A, B, C and E viruses) using the following commercially available enzyme-linked immunoassays (ELISAs): Anti-HAV IgM (Abbott Laboratories, IL, USA), Vikia HBsAg (bioMérieux, Craaponne, France), Murex anti-HCV version 4.0 (Diasorin, Midrand, South Africa) and bioELISA HEV IgM version 3.0 (Biokit, Barcelona, Spain). The blood samples were also analyzed using rapid tests for syphilis and HIV-1/2 (DPP<sup>®</sup>, Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil), dengue and leptospirosis (SD Bioline, Standard Diagnostics, Suwon, South Korea). Other infectious and autoimmune diseases were assayed by chemiluminescent ELISA for CMV, Epstein–Barr virus and antinuclear antibodies (ANAs) (Abcam, MA, USA). Infection with human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2) and human herpes virus 6 was investigated using a multiplex qPCR TaqMan assay as previously described [25]. Metabolic disorders were also investigated when routine exams (biochemical or hematological) presented alterations or if the patient had a family history of metabolic disorders. The frequent use of regular drugs was asked at the moment of hospital admission.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Institute Oswaldo Cruz, Fiocruz (protocol #1.896.353).

### Biochemical analysis

To assess the liver inflammatory status, commercial colorimetric assay kits (Abbott) were used to determine the levels of liver enzymes (aspartate transaminase [AST], alanine transaminase [ALT],  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase and total bilirubin from ALF).

### Serologic & molecular tests for B19V

Serological and molecular tests for B19V were carried out in serum samples collected during the liver transplantation procedure.

Anti-B19V IgG and IgM antibodies were evaluated by commercial ELISA (Biotrin International Ltd., Dublin, Ireland). B19V DNA was extracted from sera and liver explant samples using a QIAamp DNA Blood Mini kit and QIAamp Fast DNA Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively. For B19V DNA detection, semi-nested PCR using primer pairs P12/P16 (nt 4127–4689) and P13/P16 (nt 4214–4689) for partial amplification of the VP1/VP2 capsid gene was performed [26]. The B19V load was determined by real-time PCR using the TaqMan system (7500 Real-Time PCR system, Applied Biosystems, MA, USA). For absolute quantification, a synthetic standard curve of the B19V NS1 region (custom synthesized by Integrated DNA Technologies, IA, USA) was designed (nt 1905–1987). Primers for the NS1 region (nt 1905F and 1987R) and a single-labelled 5' FAM probe (nt 1925–1948) were used [27].

### B19V isolate genotyping

To genotype B19V isolated from serum and liver tissue samples from ALF patients, 476-bp PCR products were purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and then subjected to direct sequencing using a BigDye Terminator v. 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and an ABI Prism® 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems). Both strands of each amplicon were sequenced. The nucleotide sequences obtained during this study were deposited in the GenBank database under accession numbers MG572789 to MG572795.

For sequence analysis and phylogeny, sequences were aligned using BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) and compared with the genotype 1A, 1B, 2, 3A and 3B sequences available in GenBank. Data from a sample of human bocavirus (GQ243610) from GenBank were used to root the tree. A maximum likelihood tree was constructed based on the Hasegawa–Kishino–Yano plus  $\gamma$ -distribution and evolutionarily invariable (I) model [28] available in MEGA v. X software [29].

### Qualitative & quantitative analysis of B19V transcripts (mRNA) in liver

To evaluate B19V replication in liver tissues from ALF patients, the presence of B19V mRNA (transcripts) in liver samples was investigated by RT-PCR and real-time PCR (qRT-PCR). Liver tissue from a healthy liver donor was used as a negative control.

B19V mRNA was extracted from these samples using Ambion MicroPoly(A)Purist™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), which selects mRNA from total RNA preparations. The purified mRNA was further subjected to DNase I digestion (final concentration, 90 U/ml; Promega Co., WI, USA) to prevent the amplification of residual DNA before cDNA synthesis with SuperScript III Reverse Transcriptase (RT) (Life Technologies Corp., CA, USA).

The following two B19V transcript targets were evaluated by RT-PCR: nonspliced *VP1* transcripts [30] and the central exon, which is a region common to the whole ensemble of B19V transcripts [31]. Briefly, to detect nonspliced *VP1* transcripts, B19V cDNA was synthesized from pretreated mRNA (10  $\mu$ l) by reaction with 1  $\mu$ l of Superscript III RT (200 U/ $\mu$ l) (Life Technologies) and 2  $\mu$ l of B19V antisense primer (20 pmol/l) (nt 3882–3901). The cDNA was subjected to the first round of PCR using 0.5  $\mu$ l of each primer (PV1F/PV1R, 20 pmol/l) (nt 3520–3901). For the second round, 0.5  $\mu$ l of each primer (PV2F/PV2R, 20 pmol/l) (nt 3541–3867) was used [30]. To detect the central exon region of the mRNA, B19V cDNA was synthesized using 0.5  $\mu$ l of antisense primer (20 pmol/l) (nt 2334–2355). Then, RT-PCR was carried out using 0.5  $\mu$ l of each primer (2210F/2355R, nt 2210–2355; 20 pmol/l) [31].

To control for residual DNA amplification, two parallel reactions with (RT+) or without (RT-) the reaction mixture were performed for each sample and cDNA synthesis was then carried out as described above. All PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

Liver expression of specific B19V *NS1* transcripts was determined by Sybr Green qRT-PCR with an Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system. Two *NS1*-specific primers (nt 0534F and nt 0622R) were used to amplify the gene fragment [31]. Message RNA transcription was standardized against transcription of the housekeeping gene *GAPDH*. The transcript levels were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$ -method relative to the housekeeping *GAPDH* gene =  $2^{\Delta\Delta C_t}$  with  $\Delta C_t = C_{tGAPDH} - C_{tB19V NS1}$ .

### Statistical analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation at a 95% CI and frequencies. The distribution of the data in the groups was initially evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. We used Student's *t*-test as appropriate to analyze the differences in mean transaminase and pro-inflammatory cytokine levels between B19V+ and B19V- patients. All data were analyzed by two-tailed tests and differences with a *p*-value less than 0.05 were considered



Short Communication Alves, Melgaço, Garcia *et al.***Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population.**

Parameter	ALF patients (n = 30)
Age (years; mean ± SD)	25.73 ± 17.48
<b>Gender (%)</b>	
Female	22 (73)
Male	8 (27)
<b>ALF cause (%)</b>	
Virus <sup>†</sup>	9 (30)
Drug	5 (17)
Metabolic disorder <sup>‡</sup>	2 (7)
Autoimmune	3 (10)
Undetermined	11 (36)
<b>HE score (%)</b>	
I	1 (3)
II	9 (30)
III	5 (17)
IV	8 (27)
Unknown	7 (23)
<b>Outcome (%)</b>	
Recovery	12 (40)
Death	8 (27)
Unknown	10 (33)
Coagulopathy (INR) (mean ± SD)	7.54 ± 8.58
<b>Biochemical analysis (mean ± SD)</b>	
AST (U/l)	1226.73 ± 1496.47
ALT (U/l)	799.57 ± 665.78
Total bilirubin (mg/dl)	27.06 ± 15.26

<sup>†</sup>Virus-induced ALF excludes B19V infection.<sup>‡</sup>Metabolic disorder includes Wilson's disease.

ALF: Acute liver failure; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase; HE: Hepatic encephalopathy; INR: International normalized ratio; NA: Not analyzed; SD: Standard deviation.

significant. Statistical analyses were performed using the statistical program GraphPad InStat 3.0.1. (GraphPad Software, CA, USA).

## Results

### Characterization of the study population

Demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 1. The study population was classified according to the etiology of ALF and clinical conditions as follows: virus-induced causes of ALF, including hepatitis A virus (HAV) infection (n = 4), HAV/CMV coinfection (n = 1), hepatitis B virus infection (HBV) (n = 3) and HIV/HBV coinfection (n = 1); drug-induced (n = 5) causes of ALF; metabolic disorder-induced (n = 2) ALF, including cases of Wilson's disease; autoimmune causes of ALF (n = 3); and cryptogenic causes of ALF (n = 11). Eight (27%) patients progressed to death. Among them, five were from group 1 (two with HBV and three with HAV infections) and the other three were cryptogenic cases.

### Serological & molecular B19V markers in ALF patients

Anti-B19V antibody status and the results of B19V DNA analysis are shown in Table 2. Anti-B19V IgG was found in 6/30 patients (20%). None of the serum samples from the 30 patients showed detectable anti-B19V IgM. B19V DNA was detected in matched serum and explanted liver samples from 7/30 patients (23%). The liver samples of all but one patient (drug-induced ALF) that tested positive for B19V DNA were also positive for anti-B19V IgG. The viral load in the serum ranged from  $1.07 \times 10^3$  to  $8.58 \times 10^3$  copies/ml and that in the liver ranged from  $2.56 \times 10^4$  to  $1.65 \times 10^5$  copies/ml. All control group patients (n = 5) were negative for B19V markers.

The mean age of the seven B19V DNA-positive patients was 35.6 years old. Among them, only two were children (9 and 11 years old) and all of them were female. According to the etiology and clinical conditions of the ALF

**Table 2. Laboratory parameters and B19V markers in the acute liver failure cases.**

Parameters	ALF-B19V patients						
	ALF 01	ALF 02	ALF 03	ALF 04	ALF 05	ALF 06	ALF 07
Age (years)	9	11	31	48	49	49	52
Year of collection	2006	2005	2009	2008	2008	2004	2005
Gender	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female
ALF cause	Cryptogenic	Drug (rifampicin)	Acute hepatitis B	Autoimmune	Cryptogenic	Acute hepatitis B	Cryptogenic
Outcome	Death	Survival	Death	Survival	Death	Death	Survival
Coagulopathy (INR)	8.8	3.5	18.2	3.6	3.7	14.6	6.8
HE (score)	III	I	III	II	IV	IV	II
Jaundice	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
AST (U/l)	1860	1662	122	1112	204	775	410
ALT (U/l)	1490	1842	412	1553	182	1003	283
Total bilirubin (mg/dl)	26.7	7.3	63	23.5	4.4	21.4	21.1
RBC (milles/mm <sup>3</sup> )	2.85	5.97	2.4	4.46	3.02	2.8	4.49
Hemoglobin (g/dl)	8.2	11.6	6.8	14.4	7.1	6.5	11
Hematocrit (%)	23.1	34.2	20.5	42.5	20.1	21.1	35
Leucocyte (milles/mm <sup>3</sup> )	4.93	7.55	13.5	9.4	13.2	12.9	7
Lymphocyte (milles/mm <sup>3</sup> )	2	7	6	8	9	5	25
Platelets (milles/mm <sup>3</sup> )	59	83	140	45	327	130	285
B19V IgM	-	-	-	-	-	-	-
B19V IgG	+	-	+	+	+	+	+
B19V load serum (copies/ml)	$8.52 \times 10^3$	$8.58 \times 10^3$	$7.2 \times 10^3$	$10.7 \times 10^3$	$3.51 \times 10^3$	$3.49 \times 10^3$	$5.78 \times 10^3$
B19V load liver (copies/ml)	$1.65 \times 10^5$	$9.55 \times 10^4$	$3.80 \times 10^4$	$6.25 \times 10^4$	$6.52 \times 10^4$	$3.92 \times 10^4$	$2.56 \times 10^4$
B19V genotype	1A	1A	1A	3B	3B	3B	3B
B19V mRNA (central exon)	+	-	-	+	+	-	+
Comorbidities	CMV (+), HSV1/2 (+); pneumonia	CMV (+), HSV1/2 (+); bone tuberculosis	HBsAg (+), anti-HBc IgM (+)	No	Renal insufficiency	HBsAg (+), anti-HBc IgM (+)	No
Liver histological changes	NI	Submassive hepatic necrosis; cholestasis	Massive hepatic necrosis	Submassive hepatic necrosis; intense cholestasis	Severe hepatic necrosis; mild cholestasis	Massive hepatic necrosis	Submassive hepatic necrosis

–: Negative; +: Positive; ALF: Acute liver failure; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase; HE: Hepatic encephalopathy; INR: International normalized ratio; NI: Noninformed; RBC: Red blood cell.

patients with B19V DNA, two had virus-induced ALF (ALF 03 and 06) with acute hepatitis B (HBsAg- and anti-HBc IgM-positive); one had drug-induced ALF (ALF 02); one had autoimmune ALF and CMV infection (ALF 04) and the other three had cryptogenic ALF (ALF 01, 05 and 07). Four patients with B19V DNA progressed to death (ALF 01, 03, 05 and 06). Among them, two had acute hepatitis B and two were classified as having cryptogenic causes. These cryptogenic cases showed comorbidities such as pneumonia (ALF 01) and renal insufficiency (ALF 05; Table 2).

Among the seven B19V DNA sequences obtained from the ALF liver explant samples, three were classified as genotype 1A and four were classified as genotype 3B (Figure 1).

#### Detection & quantification of B19V mRNA

Through RT-PCR, B19V mRNA of the central exon region was detected in the liver samples of three patients with cryptogenic ALF (ALF 01, 05 and 07) and another patient with autoimmune ALF (ALF 04). Nonspliced *VP1* transcripts were also detected in the liver of an infant patient with cryptogenic ALF (ALF 01; Table 2).

Short Communication Alves, Melgaço, Garcia *et al.*

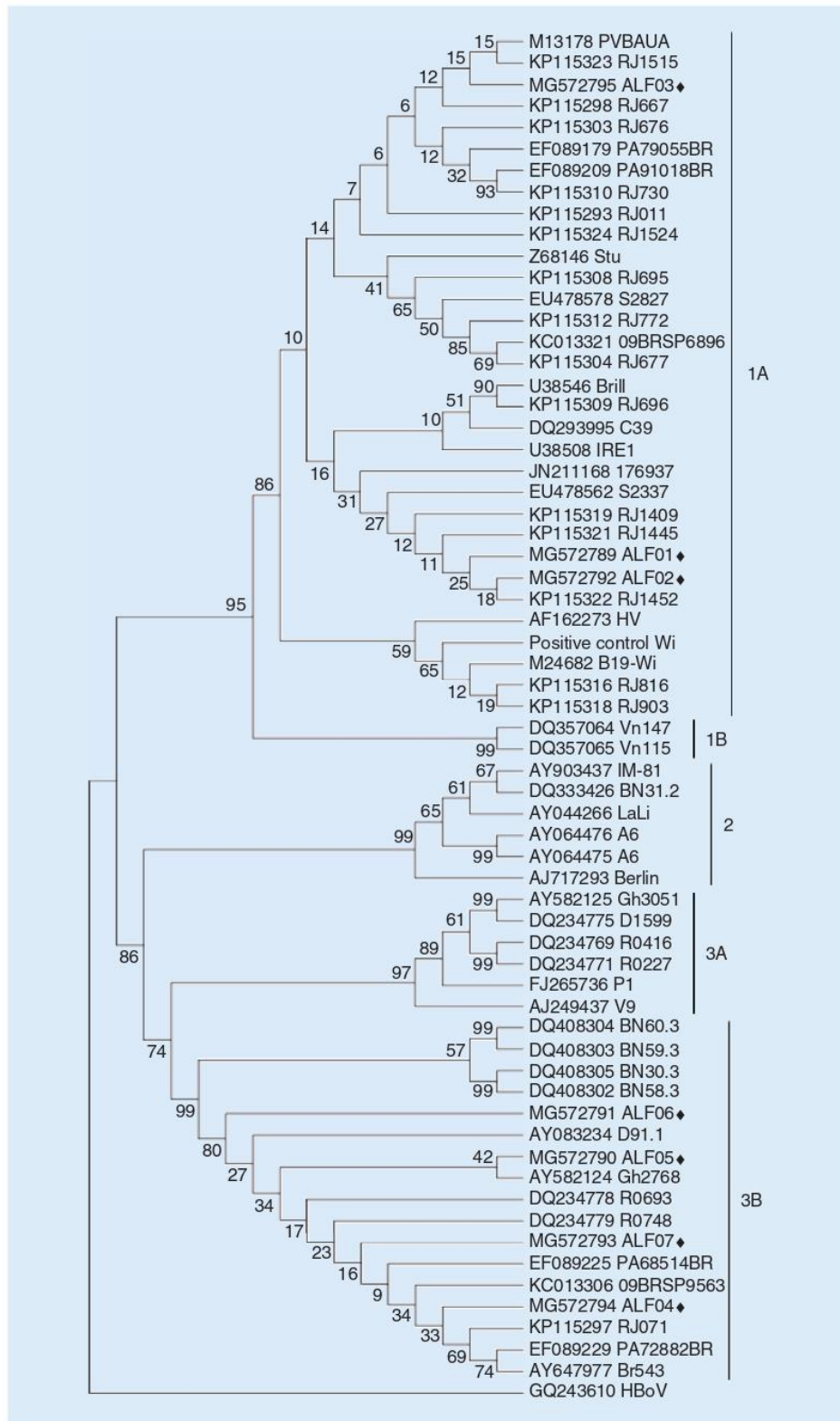
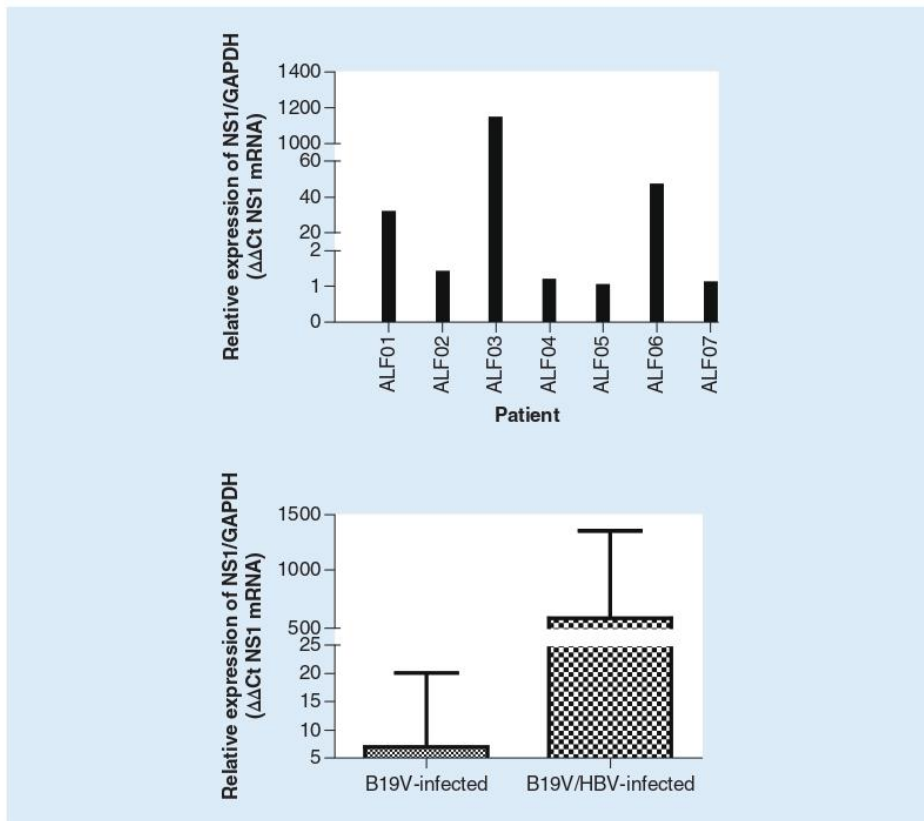


Figure 1. Evolutionary history of B19V genotypes inferred by using the maximum likelihood method and the Hasegawa–Kishino–Yano model. All analyses were conducted in MEGA X. The samples in this study were marked by gray diamonds.





**Figure 2.** Quantitative analysis of NS1 transcript expression calculated using the  $\Delta\Delta C_t$ -method relative to the housekeeping *GAPDH* gene =  $2\Delta C_t$  with  $\Delta C_t = C_{tGAPDH} - C_{tB19V\ NS1}$ . (A) Level of NS1 expression in acute liver failure patients. Vertical bars represent the mean of duplicates. The Y-axis is scaled based on the level of expression in each patient. (B) Pattern of NS1 expression according the cause of acute liver failure (B19V mono-infected and B19V/HBV co-infected patients). Vertical bars represent the mean  $\pm$  SD of each group. ALF: Acute liver failure; Ct: Cycle threshold; SD: Standard deviation.

The expression of *NS1* transcripts was analyzed by qRT-PCR. As shown in Figure 2, NS1 was expressed in liver tissues from all ALF patients (Figure 2A), with the highest expression level found in two patients co-infected with HBV (Figure 2B). Amplification of B19V DNA did not occur in the absence of reverse transcriptase, indicating the absence of residual DNA contamination.

#### Clinical manifestations & biochemical & histopathological analyses of ALF patients

Among B19V-positive ALF patients, two had anemia (ALF 02 and 07) (hemoglobin  $\leq 12$  g/dl) and four of them had severe anemia (ALF 01, 03, 05 and 06) (hemoglobin  $\leq 10$  g/dl). Thrombocytopenia was observed in five patients (ALF 01, 02, 03, 04 and 06) (platelets  $\leq 150$  miles/mm<sup>3</sup>).

All B19V-positive ALF patients had high values of ALT (mean value = 969 U/l, mean value in healthy subjects = 38 U/l) and AST (mean value = 84 U/l, mean value in healthy subjects = 41 U/l), 29% had jaundice and 57% showed an altered INR (INR in healthy subjects = 2–4). According to hepatic encephalopathy scoring, one patient had grade 1 and 2, each had grades 2, 3 and 4 (Table 2).

The mean levels of pro-inflammatory cytokines in ALF-B19V-positive patients were 793.32 pg/ml for IL-6 (normal value = 5.9 pg/ml), 91.86 pg/ml for IL-8 (normal value = 16 pg/ml) and 123.63 pg/ml for IL-10 (normal value = 9.1 pg/ml). There was no statistically significant difference in levels of the transaminases ALT ( $p = 0.83$ ; 95% CI: 760.8–629.1), AST ( $p = 0.35$ ; 95% CI: 521.1–1384.7) and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $p = 0.29$ ; 95% CI: 231.9–86.2) and the pro-inflammatory cytokines IL-6 ( $p = 0.59$ ; 95% CI: 1560.0–1025.3) and IL-8 ( $p = 0.29$ ; 95% CI: 719.8–2280.9) between B19V-positive and B19V-negative ALF patients.

Short Communication Alves, Melgaço, Garcia *et al.*

In general, all liver sections analyzed in this study showed similar histopathological findings: massive to submassive necrosis with cholestasis, inflammatory infiltration around necrotic areas, diffuse hepatocyte tumefaction and cholestatic changes, all of which are consistent with ALF (data not shown).

### Discussion

In this study, we investigated the presence of B19V infection in liver explants from ALF patients and the contribution of B19V infection to liver dysfunction. B19V DNA was detected in matched serum and liver samples from seven ALF patients. Among 11 ALF-patients with unknown etiology, three were B19V DNA-positive. The detection rate of B19V DNA (7/30; 23%) was in accordance with the findings of Eis-Hubinger and colleagues [8], who showed a high incidence of B19V infection in the livers of patients with liver dysfunction (43%) and in liver samples from autopsied patients (24%). Additionally, Wong and colleagues demonstrated that B19V DNA could be detected in the liver biopsies of 30% (10/30) of patients with HBV and/or HCV infection [32].

In healthy populations (blood donors) around the world, the rate of B19V DNA detection varies from 0.02% in The Netherlands [33] to 20.91% in China [34]. In Brazil, although these data are scarce, the detection rate of B19V DNA among blood donors is 1.9% [35]. These data demonstrate the decreased prevalence of B19V DNA in the healthy population than in the ALF patients (23%) investigated in this present study.

B19V genotype 1 was detected in three ALF patients, while genotype 3b was detected in four ALF patients. Unexpectedly, genotype 3 was the most prevalent, although B19V genotype 1 is the most common in Brazil [36–38]. Based on a few available reports, the frequencies of genotypes 1 and 3 in Brazil are 87.9 and 11.7%, respectively [39]. Brazilian studies have shown the detection of genotype 3b in anemic HIV-infected patients [37,40], in a patient with systemic lupus erythematosus and in children from Belém in the state of Pará with exanthematic disease [37]. Ferry and colleagues found B19V genotype 3 in few samples of a large cohort of HIV-infected anemic patients in Swiss [41].

Most of the ALF patients with B19V DNA were positive for anti-B19V IgG (6/7) and all of them were negative for anti-B19V IgM antibody, excluding the hypothesis of acute infection and indicating persistent B19V infection in the liver, which is consistent with previous studies investigating the livers (explants) of adult patients with ALF [8,10,13,14]. In the patient with drug-induced ALF (ALF 02), anti-B19V IgG was undetectable. In this case, the classic opportunistic pathogens detected (tuberculosis, CMV and HHV 1/2) suggest an immune system disorder that may be the reason for the undetectable levels of anti-B19V IgG. Another possible explanation is a false-negative serological result due to amounts of anti-B19V IgG in complex with viral particles [42].

Histopathological findings in the liver revealed changes that were consistent with acute hepatitis. Submassive to severe hepatic necrosis was observed in five patients and cholestasis was observed in two patients. According to Hatakka and colleagues [11], the liver biopsies of patients infected with B19V displayed cholestasis, apoptosis and variable amounts of necrosis depending on the severity of liver involvement and the immune status of the host. The reduced viral loads detected in the serum and liver samples from ALF patients are also suggestive of persistent infection with B19V [23]. Our data reinforce the importance of the combination of serological and molecular assays for the correct diagnosis of acute or persistent B19V infection [43].

B19V transcripts (mRNA) were detected in all patients with liver dysfunction in this study. These data indicate the active genic expression of structural and nonstructural proteins [30,31], which is indicative of intrahepatic B19V replication with active and productive infection. According to Karenyi and colleagues [14], the detection of B19V capsid protein (*VP1* and *VP2*) mRNA provides strong evidence for B19V infection during the course of non-A-E ALF and suggests a role for the B19V virus in liver injury. Until now, the mechanism of hepatic injury caused by B19V has remained unclear. Poole and colleagues [9] have proposed that direct viral invasion causes cell damage. This cell damage could be explained by the presence of globosides, the main cell receptor in this viral infection, detected on hepatocyte membranes [43] and in red line cells in bone marrow [44]. In hepatocytes, the replication of B19V produces nonstructural protein 1 (NS1); this protein is related to the induction of arrest at G1 phase in the cell cycle. Hepatocytes arrested at G1 phase in the cell cycle seems to undergo apoptosis through the activation of caspase-3 and caspase-9. This cell death could explain the direct cytopathic effect of B19V on liver cells [9,45].

According to previous studies, co-infection with B19V and other hepatotropic viruses, such as HBV, increases the severity of disease [19,46,47]. Together, these results suggest that B19V causes liver injury independently and produces a synergistic effect during co-infection with HBV that worsens prognosis. In addition, the concomitant detection of *VP1* and *NS1* transcripts demonstrated the production of complete virions in hepatocytes. However,



in this study, it was not possible to evaluate the outcome of ten ALF-patients, which prevent the association of the B19V as a cause of the death of some patients.

Additional evidence of active B19V infection in almost all ALF patients was the presence of anemia and reduced platelet blood counts (thrombocytopenia), which are typical signals of bone marrow impairment associated with B19V infection [47]. However, although the drug-induced ALF (ALF 02) and autoimmune-ALF (ALF 04) patients did not show anemia or jaundice, both showed thrombocytopenia as a signal of bone marrow involvement.

Included in this study were 11 (36.7%) patients with ALF of unknown etiology (cryptogenic). Three of them (ALF 01, 05, 07) were classified as having persistent and productive B19V infection with detectable anti-B19V IgG, B19V DNA and mRNA markers. All of them showed jaundice, anemia and anisocytosis.

This study has limitations inherent to retrospective studies involving archived samples and the review of medical records. One limitation is a lack of information, such as the outcome of ten patients, which did not allow us to evaluate the association between the detection of B19V in the liver and outcome (survival or death). Other limitations are the small size of the control group and the lack of data on the characteristics of anemia, reticulocyte count, mean corpuscular volume of red cells and level of serum ferritin.

### Conclusion

Our findings suggest that B19V contributes to liver injury in ALF cases and worsens outcome in co-infected patients. However, long-term longitudinal studies are required to demonstrate the causal relationship between B19V infection and ALF. Our data highlight the importance of B19V infection in the differential diagnosis of ALF, mainly during epidemic periods of erythema infectiosum and in patients with refractory anemia.

### Future perspective

In the future, B19V should be considered as an additional infectious agent with the diagnosis of ALF, mainly during epidemic periods of erythema infectiosum and in patients with refractory anemia. In addition, long-term longitudinal studies are required to demonstrate the causal relationship between B19V infection and ALF.

#### Summary points

- Parvovirus B19 has been recognized as a self-limiting cause of acute hepatitis and an uncommon cause of liver disorders; therefore, the pathogenic role of B19V in liver injury is suggested.
- A high prevalence of B19V DNA (23%) was detected in the livers of acute liver failure (ALF) patients.
- Most of the ALF patients with B19V DNA were positive for anti-B19V IgG (6/7) and all of them were negative for anti-B19V IgM antibody, indicating persistent B19V infection in the liver.
- B19V transcripts were detected in all patients in this study, with the highest expression level found in patients co-infected with hepatitis B virus infection, providing evidence of intrahepatic B19V replication with active and productive infection.
- B19V may have contributed to liver injury in the ALF cases and worsened the outcome in co-infected patients.
- In the future, B19V should be considered as an additional infectious agent with the diagnosis of ALF, mainly during epidemic periods of erythema infectiosum and in patients with refractory anemia.

#### Author contributions

ADR Alves, MA Pinto and LA Amado were involved in the conception and design of this study and in analysis and interpretation of the data. ADR Alves and JV Raposo were involved in perform the tests. All authors were involved in the drafting of the paper and the final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work.

#### Acknowledgments

Thanks to L Agolia from Medical records service of Hospital Federal de Bonsucesso for support in analysis of medical records in ALF patients; DC dos Santos from LADTV/IOC/FIOCRUZ for storing and selecting samples as well as providing data on ALF patients.

#### Financial & competing interests disclosure

Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ) funded this study and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the fellowship awarded by ADR Alves. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Short Communication Alves, Melgaço, Garcia *et al.*

#### Ethical conduct of research

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Institute Oswaldo Cruz, Fiocruz (protocol #1.896.353). In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

#### References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Byass P. The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. *BMC Med.* 12(159), 1–3 (2014).
2. Lee WM. Acute liver failure. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 33(1), 36–45 (2012).
3. Kim TS, Joh JW, Moon H *et al.* The different etiology of fulminant hepatic failure (FHF) in Korea and prognostic factors in patients undergoing liver transplantation for FHF. *Clin. Transplant.* 27(2), 297–302 (2013).
4. Lefkowitz JH. The pathology of acute liver failure. *Adv. Anat. Pathol.* 23(3), 144–158 (2016).
5. Codes L, Bahia UF, Schinoni MI *et al.* Acute cryptogenic hepatitis: a heterogeneous entity, with possible complications. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(4), 293–298 (2006).
6. Tannuri AC, Porta G, Kazue-Miura I *et al.* Pediatric acute liver failure in Brazil: is living donor liver transplantation the best choice for treatment? *Liver Transpl.* 22(7), 1006–1013 (2016).
7. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 369(26), 2525–2534 (2013).
- **Reviews the major aspects of acute liver failure around the world**
8. Eis-Hübinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Pütz U. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J. Med. Virol.* 65(2), 395–401 (2001).
9. Poole BD, Karetnyi YV, Naides SJ. Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J. Virol.* 78(14), 7775–7783 (2004).
10. Naides SJ, Karetnyi YV, Cooling LL, Mark RS, Langnas AN. Human parvovirus B19 infection and hepatitis. *Lancet* 347(9014), 1563–1564 (1996).
11. Hatakka A, Klein J, He R, Piper J, Tam E, Walkty A. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Microbiol.* 49(9), 3422–3424 (2011).
- **Reports a case of B19V infection in acute hepatitis patient**
12. Sun L, Zhang JC, Jia ZS. Association of parvovirus B19 infection with acute icteric hepatitis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 43(6–7), 547–549 (2011).
13. Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* 22(6), 1661–1665 (1995).
14. Karetnyi YV, Beck PR, Markin RS, Langnas AN, Naides SJ. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch. Virol.* 144(9), 1713–1724 (1999).
15. Diaz F, Collazos J. Hepatic dysfunction due to parvovirus B19 infection. *J. Infect. Chemother.* 6(1), 63–64 (2000).
16. Ho JK, Tha SP, Coupland R *et al.* Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. *Can. J. Gastroenterol.* 19(3), 161–162 (2005).
17. Leon LAA, Alves ADR, Garcia RCNC, Melgaço JG, de Paula VS, Pinto MA. Parvovirus B19 Infection in a fatal case of acute liver failure. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36(12), e355–e358 (2017).
- **Report a fatal case of B19V infection in a Brazilian cryptogenic acute liver failure patient.**
18. Hsu TC, Chen TY, Lin MC, Tzang BS, Tsay GJ. Human parvovirus B19 infection in patients with chronic hepatitis B or hepatitis C infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20(5), 733–738 (2005).
19. Dwivedi M, Manocha H, Tiwari S, Tripathi G, Dhole TN. Coinfection of parvovirus b19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28(7), 649–650 (2009).
20. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(3), 485–505 (2002).
21. Knoester M, von dem Borne PA, Vossen AC, Kroes AC, Claas EC. Human parvovirus B19 genotype 3 associated with chronic anemia after stem cell transplantation, missed by routine PCR testing. *J. Clin. Virol.* 54(4), 368–370 (2012).
22. Lindblom A, Isa A, Norbeck O *et al.* Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin. Infect. Dis.* 41(8), 1201–1203 (2005).
23. Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG, Hobbs JA. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res.* 90, 8–16 (2014).
- **Review the major aspects of persistent infection of B19V in nonerythroid tissues.**
24. Sugawara K, Nakayama N, Mochida S. Acute liver failure in Japan: definition, classification and prediction of the outcome. *J. Gastroenterol.* 47(8), 849–861 (2012).
25. Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J. Clin. Virol.* 42(4), 326–334 (2008).



26. Durigon EL, Erdman DD, Gary GW, Pallansch MA, Torok TJ, Anderson LJ. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* 44(2-3), 155-165 (1993).
27. Alves ADR, Cubel Garcia RCN, Cruz OG, Pinto MA, Amado Leon LA. Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. *Exp. Rev. Mol. Diag.* 19(3), 259-266 (2019).
- **Demonstrates a sensible and specific tool to detection and quantification of B19V**
28. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22(2), 160-174 (1985).
29. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6), 1547-1549 (2018).
30. Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int. J. Med. Sci.* 4(2), 105-109 (2007).
31. 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* 381(2), 168-177 (2008).
32. Wong S, Young NS, Brown KE. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J. Infect. Dis.* 187(10), 1581-1586 (2003).
33. Kooistra K, Mesman HJ, Waal M *et al.* Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003-2009. *Vox. Sang.* 100(3), 261-266 (2011).
34. Yang ZX, He HJ, Dai F *et al.* Investigation on HPV B19 infection in 110 blood donors. *J. Huazhong Univ. Sci. Tech.* 32, 344-345 (2003).
35. Slavov SN, Rodrigues ES, Sauvage V *et al.* Parvovirus B19 seroprevalence, viral load and genotype characterization in volunteer blood donors from Southern Brazil. *J. Med. Virol.* 91(7), 1224-1231 (2019).
36. Freitas RB, Melo FL, Oliveira DS *et al.* Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. *J. Clin. Virol.* 43(1), 60-65 (2008).
37. Keller LW, Barbosa ML, Melo FL *et al.* Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of an erythrovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. *Arch. Virol.* 154(10), 1685-1687 (2009).
38. Cubel Garcia RCN, Pereira RFA, Azevedo KML *et al.* Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. *Bras. J. Infect. Dis.* 21(1), 102-106 (2016).
39. Jain A, Jain P, Kumar A, Prakash S, Khan DN, Kant R. Incidence and progression of parvovirus B19 infection and molecular changes in circulating B19V strains in children with hematological malignancy: a follow up study. *Infect. Genet. Evol.* 57, 177-184 (2018).
40. Pereira RF, Cubel Garcia RCN, Azevedo KM, Setúbal S, Siqueira MA, Oliveira SA. Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109(2), 168-173 (2014).
41. Ferry T, Hirschel B, Dang T *et al.* Infrequent replication of parvovirus B19 and erythrovirus genotypes 2 and 3 among HIV-infected patients with chronic anemia. *Clin. Infect. Dis.* 50(1), 115-118 (2010).
42. Bredl S, Plentz A, Wenzel JJ, Pfister H, Möst J, Modrow S. False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 51(2), 115-120 (2011).
43. Koliou M, Karaoli E, Soteriades ES, Pavlides S, Bashiardes S, Christodoulou C. Acute hepatitis and myositis associated with Erythema infectiosum by parvovirus B19 in an adolescent. *BMC Pediatr.* 14, 6 (2014).
44. Brown KE, Young NS. Parvoviruses and bone marrow failure. *Stem Cells* 14(2), 151-163 (1996).
45. Leon LA, Marchevsky RS, Gaspar AM *et al.* Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111(4), 258-266 (2016).
46. Kishore J, Sen M. Parvovirus B19-induced thrombocytopenia and anemia in a child with fatal fulminant hepatic failure coinfected with hepatitis A and E viruses. *J. Trop. Pediatr.* 55(5), 335-337 (2009).
47. Bihari C, Rastogi A, Saxena P *et al.* Parvovirus B19 associated Hepatitis. *Hepat. Res. Treat.* 2013(472027), 1-9 (2013).
- **Highlights the B19V infection in a range of hepatitis-related diseases.**

### 3.4 Diagnóstico laboratorial de parvovirus B19 em pacientes com doença renal crônica

**Título:** *High prevalence of parvovirus B19 infection in patients with chronic kidney disease under hemodialysis: a multicenter study*

**Autores:** Arthur Daniel Rocha Alves, Barbara Barbosa Langella, Jakeline Ribeiro Barbosa, Danielle Malta Lima, Jeová KenyBaima Colares, Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia, Marcelo Alves Pinto, Livia Melo Villar, Luciane Almeida Amado.

**Revista:** Publicado no periódico *International Journal of Infectious Diseases* (Fator de impacto = 3.623 e Qualis para Medicina 2 = B1).

**Resumo:** A infecção por parvovírus B19 (B19V) é geralmente aguda e autolimitada, mas em pacientes com doenças renais crônicas (DRC) sob tratamento de hemodiálise, essa infecção pode aumentar a suscetibilidade dos pacientes à anemia aguda e crônica. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência e o risco da infecção por B19V em pacientes brasileiros com DRC sob tratamento de hemodiálise. O estudo foi conduzido com 221 pacientes DRC e 142 doadores de sangue como grupo controle. A infecção por B19V foi avaliada em amostras de soro por PCR em tempo real e ELISA (anticorpos IgM e IgG anti-B19V). B19V-DNA foi detectado em 65% (145/221) dos pacientes DRC, sendo significativamente maior ( $p < 0,001$ ) que em doadores de sangue (6,3%). A detecção simultânea de B19V-IgG e de viremia foi observada em 40,3% dos pacientes DRC, sendo indicativo de infecção persistente por B19V. Pacientes DRC apresentaram um risco maior de desenvolverem infecção por B19V (OR=28,1; CI=13,5-58,5;  $p=0,001$ ). Apesar da ausência de sinais clínicos da infecção por B19V, os dados apresentados destacam a importância da infecção por B19V nessa população de alto risco, uma vez que a infecção persistente por B19V pode se tornar clinicamente significativa após o transplante renal. Além disso, a viremia persistente pode ser considerada como um risco potencial, principalmente devido à contaminação de equipamentos de diálise.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)

## High prevalence of parvovirus B19 infection in patients with chronic kidney disease under hemodialysis: A multicenter study



Arthur Daniel Rocha Alves<sup>a,\*</sup>, Barbara Barbosa Langella<sup>a</sup>, Jakeline Ribeiro Barbosa<sup>b</sup>, Danielle Malta Lima<sup>c</sup>, Jeová Keny Baima Colares<sup>c</sup>, Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia<sup>d</sup>, Marcelo Alves Pinto<sup>a</sup>, Livia Melo Villar<sup>e</sup>, Luciane Almeida Amado<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Evidências para Políticas e Tecnologias de Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Brasília, DF, Brazil

<sup>c</sup> Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 June 2020

Received in revised form 1 September 2020

Accepted 4 September 2020

#### Keywords:

Chronic kidney disease

Dialysis

Parvovirus B19

Prevalence

Risk

### ABSTRACT

**Objectives:** Parvovirus B19 (B19V) infection is commonly acute and self-limited, but in chronic kidney disease (CKD) patients under dialysis treatment, this infection could increase susceptibility to acute and chronic anemia. The aim of this study was to evaluate the frequency and risk of B19V infection among Brazilian CKD patients under dialysis.

**Methods:** A study was conducted among 221 CKD patients and a control group of 142 blood donors. B19V infection was evaluated in serum samples by real-time PCR, and ELISA (anti-B19V IgM and IgG).

**Results:** B19V DNA was detected in 65% (145/221) of CKD patients, which was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in the blood donors (6.3%). Simultaneous detection of B19V IgG and viremia was shown in 40.3% of CKD patients, which was indicative of persistent B19V infection. CKD patients showed an increased risk of developing B19V infection (OR = 28.1, CI = 13.5–58.5,  $p = 0.001$ ).

**Conclusions:** Despite an absence of clinical signs of B19V infection, these data highlight the importance of B19V infection in this high-risk population, since a persistent B19V infection could become clinically significant after renal transplant. Moreover, the persistent viremia should be considered as a potential risk, mainly because of the contamination of dialysis equipment.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Introduction

Parvovirus B19 (B19V), a member of *Parvoviridae* family and *Erythroparvovirus* genus, is a small, non-enveloped, icosahedral, ssDNA virus that infects only humans (Cotmore et al., 2019).

B19V is mainly transmitted in close contact, by the inhalation of viral particles in aerosol (i.e. respiratory spread transmission). Transmission may also occur through blood-donor transfusion and transplantation, mostly during the viremia that precedes the seroconversion period, as well as vertically, from mother to fetus (Gallinella, 2018; Ozeki et al., 2006).

Common B19V-related diseases are associated with age, and the hematological and immunological status of the host. In immunocompetent individuals, B19V infection is commonly acute, benign,

and self-limited by the appearance of specific IgM and IgG antibodies, leading to a rapid and complete clearance of viremia (Adamson-Small et al., 2014). It usually causes a common childhood exanthematic disease known as erythema infectiosum (EI), arthropathy in adults, and aplastic crisis in patients with hemolytic diseases, with an extremely low mortality rate. In immunocompromised patients, B19V infection is not readily cleared and its long persistence leads to chronic anemia, which can be severe due to the notable tropism of B19V to human bone marrow and erythroid precursor cells for replication (Qiu et al., 2017).

However, B19V infection may persist in some individuals, regardless of their immunocompromised level and hematological status. This persistent infection could affect erythroid and non-erythroid tissue, such as bone marrow, myocardium, liver, skin, and kidney. The clinical significance of this delayed clearance and low-level viremia is often unknown and debatable (Adamson-Small et al., 2014).

\* Corresponding author.

E-mail address: [arthur.alves@ioc.fiocruz.br](mailto:arthur.alves@ioc.fiocruz.br) (A.D.R. Alves).



Chronic kidney disease (CKD) is a condition arising from various diseases, including diabetes mellitus and hypertension, which leads to a gradual loss in the rate of glomerular filtration. In patients with CKD, the treatments of choice are, in general, dialysis and kidney transplantation. Infectious diseases are the second major cause of death in CKD patients (Naqvi and Collins, 2006), and patients undergoing dialysis therapy may have increased susceptibility to many viral infections, including B19V infection, that may result in an increase in acute or chronic anemia (Webster et al., 2017).

Anemia is a common complication of CKD due to: reduced production of erythropoietin by the kidney; significantly decreased erythrocyte survival and iron deficiency; chronic uremic condition; and mineral bone disease caused by disrupted vitamin D, calcium, and phosphate metabolism (Guiseix et al., 1996; Duranay et al., 1998). Persistent B19V infection in these dialyzed patients after renal transplantation and immunosuppressive therapy can manifest as transient aplastic crisis or chronic anemia (Adamson-Small et al., 2014; Eid et al., 2013; Söderlund-Venermo et al., 2002; Norja et al., 2006; Waldman and Kopp, 2007). Nonetheless, there is a lack of information regarding B19V infection among Brazilian patients under dialysis. The aim of this study was to determine the prevalence of B19V viremia and to evaluate the risk of B19V infection among dialyzed CKD patients.

## Methods

### Study population and ethical aspects

This was a cross-sectional study that investigated parvovirus B19 infection in archived serum samples, collected during 2013–2015, from a total of 221 CKD patients who were under dialysis treatment in three different Brazilian dialysis units: unit 1 (32 patients), located in the Central region of Rio de Janeiro (Southeast Brazil), collected during January to February, 2013; unit 2 (61 patients), located in the North region of Rio de Janeiro, collected during June to July, 2014; unit 3 (128 patients), located in Ceará State (Northeast Brazil), collected during July to August, 2015. Serum samples with insufficient volume to carry out molecular and serological tests were excluded. In addition, serum samples from blood donors ( $n = 142$ ), collected in Rio de Janeiro during 2015, were included as a control group.

An epidemiological questionnaire was provided to collect demographic, clinical, and hematological data from these patients, such as age, gender, *per capita* income, race, marital status, educational level, dialysis duration, history of hepatitis, blood transfusion, and anemia.

Anemia was defined according to the World Health Organization (WHO) criteria, as a hemoglobin (Hb) concentration below 13.0 g/dL for adult males and postmenopausal women, and below 12.0 g/dL for premenopausal women; severe anemia was defined as an Hb concentration below 7 g/dL (WHO, 2011).

All sera samples had been previously tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B core antibody (anti-HBc), hepatitis B surface antibody (anti-HBs), and hepatitis C antibody (anti-HCV), detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Euroimmun, Germany), as previously reported (Ribeiro Barbosa et al., 2017).

### Molecular and serological tests for B19V

B19V infection was investigated in the serum samples collected on the day of dialysis procedure, after signed consent by the patient, using serological and molecular assays.

For molecular detection and quantification of B19V, DNA was extracted from sera samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit

(Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was carried out (Alves et al., 2019) using the TaqMan system (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA). For absolute quantification, a synthetic standard curve of the B19V NS1 region (IDT, USA) was designed (nt 1905–1987, GenBank: NC\_000883.2). Primers for the NS1 region (nt 1905F and 1987R) and a single labelled 5' FAM probe (nt 1925–1948, GenBank: NC\_000883.2) were used.

All serum samples from CKD patients were investigated for the presence of anti-B19V IgM and IgG antibodies by ELISA (VirionSerion, Germany), according to the manufacturer's instructions.

For B19V genotyping, a nested PCR (Abe et al., 2007) using the primer pairs VP1/VP1R (nt 3502–3883, GenBank: NC\_000883.2) and VP2/VP2R (nt 3541–3867, GenBank: NC\_000883.2) were performed to amplify the 326bp fragment of the VP1/VP2 capsid gene. The nested-PCR products were purified using the QIAquick gel extraction (Qiagen, Germany) and then sequenced directly using the BigDye terminator v. 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and an ABI Prism<sup>®</sup> 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, USA). Both strands of each amplicon were sequenced.

For phylogenetic analysis, sequences were aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5. A neighbor-joining tree was constructed based on Kimura-2 parameter distances available in MEGA v.10.0 software (Kumar et al., 2018). The B19V genotype was determined by including reference sequences for genotypes IA, IB, II, IIIA, and IIIB, available in Genbank.

### Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using R studio (version 1.2.1335, Boston, USA). Continuous variables were expressed as means and were compared using the Mann-Whitney *U* test. Categorical variables were expressed as number (%) and were identified according to: age (<52 and ≥52 years), gender (male or female), anemia, mean time on dialysis, HBV/HCV infection, blood transfusion, and kidney transplant. The chi-square test or Fisher exact test was used for measurement of categorical variables. The odds ratio (OR) for B19V DNA detection in CKD patients was analyzed using univariate logistic regression. All *p*-values were two-sided, with those <0.05 considered as statistically significant.

## Results

### Characterization of the studied population

A total of 221 CKD patients under dialysis were enrolled in the study. The mean age was  $51 \pm 14.1$  years and 61.5% (136/221) were male (Table 1). In dialysis units 1, 2, and 3 were enrolled 32 patients (mean age  $49 \pm 11.8$  years; 50% male), 61 patients (mean age  $54 \pm 15.2$  years; 54% male), and 128 patients (mean age  $50 \pm 13.8$  years; 68% male), respectively. The mean age of the blood donors' group was  $35 \pm 12.6$  years, with 55% male.

The mean duration of dialysis was  $70.2 \pm 75.5$  months and the dialysis interval was three times a week (Table 1). According to the dialysis units, the mean durations of dialysis were  $72.8 \pm 73.4$  months in unit 1;  $36.4 \pm 40.4$  months in unit 2; and  $85.9 \pm 83.8$  months in unit 3. The difference between units 2 and 3 was statistically significant ( $p < 0.001$ ; Figure 1).

Previous blood transfusions and kidney transplantations were reported by 59.7% (132/221) and 9.9% (22/221) of the patients, respectively. Among the kidney transplant recipients, two were from unit 1, two from unit 2, and the other 18 were from unit 3. Anemia and HBV/HCV infection were present in 32% (71/221) and 45.7% (101/221) of the individuals, respectively (Table 1).



**Table 1**

Demographic, clinical, and laboratory findings among CKD patients attending three different Brazilian dialysis units during 2013–2015.

Parameter	Totaln (%)	B19V+n (%)	B19V-n (%)	p-value <sup>a</sup>	OR (95% CI)
Gender					
Male	136 (61.5)	94 (69.1)	42 (30.9)	0.24	1.22 (0.68–2.21)
Female	79 (35.8)	51 (64.5)	28 (35.5)		
Unknown	6 (2.7)	0 (0)	6 (100)		
Age group (years)					
<52	105 (47.5)	74 (70.5)	31 (29.5)	0.17	1.31 (0.73–2.33)
≥52	110 (49.7)	71 (64.5)	39 (35.5)		
Unknown	6 (2.8)	0 (0)	6 (100)		
Per capita income					
\$110–\$180	62 (28.1)	42 (67.7)	20 (32.3)	0.38	0.76 (0.28–2.01)
\$181–\$360	57 (25.8)	36 (63.2)	21 (36.8)		
\$361–\$540	28 (12.7)	20 (71.4)	8 (28.6)		
\$541–\$720	14 (6.2)	12 (85.7)	2 (14.3)		
≥\$721	30 (13.6)	22 (73.3)	8 (26.7)		
Unknown	30 (13.6)	13 (43.3)	17 (56.7)		
Race/ethnicity					
White	55 (24.9)	37 (67.3)	18 (32.7)	0.47	0.98 (0.50–1.89)
Black	146 (66.1)	99 (67.8)	47 (32.2)		
Asian	5 (2.3)	5 (100)	0 (0)		
Unknown	15 (6.7)	4 (26.6)	11 (73.4)		
Marital status					
Unmarried	61 (27.6)	41 (67.2)	20 (32.8)	0.32	0.80 (0.41–1.59)
Married <sup>b</sup>	110 (49.8)	79 (71.8)	31 (28.2)		
Divorced	26 (11.8)	17 (65.4)	9 (34.6)		
Widowed	14 (6.3)	8 (57.1)	6 (42.9)		
Unknown	10 (4.5)	0 (0)	10 (100)		
Educational level					
Non-literate	15 (6.8)	11 (73.3)	4 (26.7)	0.12	0.41 (0.13–1.37)
Primary	69 (31.2)	43 (62.3)	26 (37.7)		
Secondary	40 (18.1)	26 (65.0)	14 (35.0)		
Higher secondary	54 (24.4)	39 (72.2)	15 (27.8)		
Graduate	20 (9.1)	16 (80.0)	4 (20.0)		
Postgraduate	11 (5.0)	9 (81.8)	2 (18.2)		
Unknown	12 (5.4)	1 (8.3)	11 (91.7)		
Time of dialysis (months)					
<48	103 (46.6)	67 (65.0)	36 (35.0)	0.26	0.71 (0.39–1.28)
≥48	108 (48.9)	78 (72.2)	30 (27.8)		
Unknown	10 (4.5)	0 (0)	10 (100)		
Hemoglobin level (g/dL)	11.53	11.60	11.87	0.85	1.23 (0.54–2.94)
Anemia					
Yes	71 (32.1)	59 (83.1)	12 (16.9)	0.83	1.11 (0.42–2.86)
No	49 (22.2)	40 (81.6)	9 (18.4)		
Unknown	101 (45.7)	46 (45.5)	55 (54.5)		
HBV/HCV infection					
Presence	101 (45.7)	63 (62.4)	38 (37.6)	0.28	0.73 (0.42–1.29)
Absence	120 (54.3)	83 (69.2)	37 (30.8)		
HBV/HCV infection and anemia					
Anemia	37 (36.6)	30 (81.1)	7 (18.9)	0.003	4.02 (1.54–10.49)
No anemia	64 (63.4)	33 (51.6)	31 (48.4)		
Blood transfusion					
Presence	132 (59.7)	88 (66.6)	44 (33.4)	0.29	0.71 (0.38–1.34)
Absence	76 (34.4)	56 (73.7)	20 (26.3)		
Unknown	13 (5.9)	1 (7.7)	12 (92.3)		
Blood transfusion and anemia					
Anemia	47 (35.6)	40 (85.1)	7 (14.9)	0.24	2.00 (0.61–6.49)
No anemia	27 (20.5)	20 (74.1)	7 (25.9)		
Unknown	58 (43.9)	28 (48.3)	30 (51.7)		
Kidney transplant					
Presence	22 (9.9)	19 (86.4)	3 (13.6)	0.06	3.19 (0.91–11.19)
Absence	188 (85.1)	125 (56.6)	63 (43.4)		
Unknown	11 (5.0)	1 (9.1)	10 (90.9)		

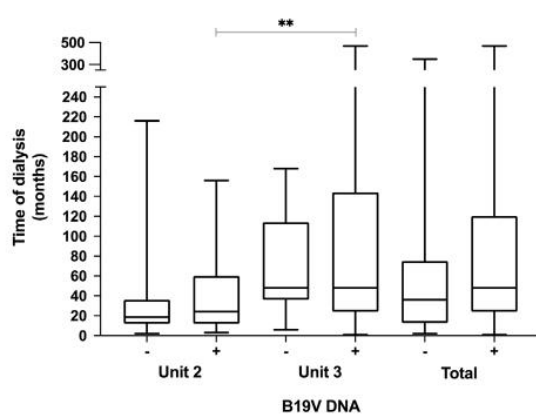
**Table 1** (Continued)

Parameter	Totaln (%)	B19V+n (%)	B19V-n (%)	p-value <sup>a</sup>	OR (95% CI)
Kidney transplant and anemia					
Anemia	8 (36.4)	8 (100)	0 (0)	0.28	5.66
No anemia	9 (41.0)	7 (77.8)	2 (22.2)		(0.23–137.8)
Unknown	5 (22.6)	4 (80.0)	1 (20.0)		

n: number; B19V: parvovirus B19; OR: odds-ratio; 95% CI: 95% confidence interval; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus.

<sup>a</sup> p-value relating to the Pearson  $\chi^2$  test.

<sup>b</sup> Stable unions included as married.



**Figure 1.** Time of dialysis among CKD patients between the units studied. Bars represent the standard deviation. Selections with \*\* ( $p < 0.001$ ) represent significant differences between groups. Results analyzed with non-parametric Mann-Whitney test.

#### Molecular and serological B19V markers

B19V DNA was often detected in CKD patients (65.6%). Of these, one (3.1%) was reported in unit 1, 37 (60.6%) in unit 2, and 107 (83.6%) in unit 3. In all dialysis units, the mean viral load detected was  $10^4$  IU/mL (Table 2).

Anti-B19V IgM and IgG were investigated among the CKD patients ( $n = 221$ ). Anti-B19V IgG prevalence was 79.2% (175/221). According to the dialysis units, anti-B19V IgG prevalence was 78.1% (25/32) in unit 1, 81.9% (50/61) in unit 2, and 78.1% (100/128) in unit 3 (Table 2). Anti-B19V IgM was detected in 15.4% (34/221) of patients: 8.2% (5/61) in unit 2 and 22.6% (29/128) in unit 3 (Table 2). No CKD patient from unit 1 had anti-B19V IgM.

As shown in Table 3, 28.5% ( $n = 63$ ) of the patients presented acute infection (B19V DNA+ and/or IgM+). However, only in 12.2% ( $n = 27$ ) was B19V DNA simultaneously detected with anti-B19V IgM. Anti-B19V IgG was found in conjunction with B19V DNA in 40.2% ( $n = 89$ ) of the patients, suggesting persistent infection among them. According to the dialysis units, unit 3 showed the highest number of acute ( $n = 52$ ) and persistent ( $n = 62$ ) infections, while unit 1 observed more patients with prior B19V exposure ( $n = 24$ ) and patients susceptible to B19V infection ( $n = 7$ ).

**Table 2**

Molecular and serological B19V markers among CKD patients attending three different Brazilian dialysis units during 2013–2015.

Study group	B19V DNA n (%)	Viral load (IU/mL)	Anti-B19V IgM n (%)	Anti-B19V IgGn (%)
Unit 1 ( $n = 32$ )	1 (3.1)	$4.0 \times 10^4$	0 (0)	25 (78.1)
Unit 2 ( $n = 61$ )	37 (60.6)	$3.8 \times 10^4$	5 (8.2)	50 (81.9)
Unit 3 ( $n = 128$ )	107 (83.6)	$4.1 \times 10^4$	29 (22.6)	100 (78.1)
Total ( $n = 221$ )	145 (65.6)	$4.0 \times 10^4$	34 (15.4)	175 (79.2)

B19V: parvovirus B19; qPCR: real-time quantitative PCR; IU/mL: international units per mL; PCR: polymerase chain reaction; IgM: immunoglobulin M; IgG: immunoglobulin G.

Nine blood donors (6.3%) tested positive for B19V DNA. Most of them were male (55.5%), with an average age of  $42 \pm 2.6$  years. B19V DNA detection was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in the CKD patients under dialysis (65%) than in the blood donors (6.3%). A significant association was observed between CKD patients under hemodialysis and B19V infection when compared with blood donors (OR = 28.1, CI = 13.5–58.5,  $p = 0.001$ ).

Nucleotide sequences were obtained successfully from only two B19V isolates from dialysis unit 3. Phylogenetic analysis revealed that these two B19V isolates were classified as genotype 1A (Figure 2). The nucleotide sequences obtained during this study were deposited in the GenBank database under accession numbers MT534175 and MT534176.

#### Clinical manifestations and biochemical analysis among CKD patients

According to Table 1, 71 of the 221 CKD patients presented with anemia (32.1%), with a mean hemoglobin level of  $11.2 \pm 1.7$  g/dL. Among the anemic patients, 83.1% (59/99) had B19V DNA. Severe anemia (Hb < 7.0 g/dL) was registered in three patients (1.4%), and all of these had B19V DNA and anti-B19V IgG.

Among the CKD patients, 101 (45.7%) presented with infection with hepatitis B virus (HBV) and/or hepatitis C virus (HCV). Most of these HBV/HCV-infected patients (62.4%) also presented with B19V infection. Coinfection of HBV/HCV with B19V increased the occurrence of anemia (OR = 4.02, CI = 1.54–10.49,  $p = 0.003$ ) (Table 1).

Blood transfusion and kidney transplant were reported by 59.7% (132/221) and 9.9% (22/221) of patients, respectively. B19V DNA was detected in all kidney transplant patients with anemia ( $n = 8$ ).

There was no significant relationship between the presence of B19V DNA and anemia, mean duration of dialysis, blood transfusion, renal transplant, age, or gender ( $p > 0.05$ ; Table 1).

#### Discussion

This was the first study to evaluate whether CKD patients undergoing dialysis are at high risk of B19V infection in Brazil. A high prevalence of B19V DNA was found among CKD patients (65%), particularly in unit 3. This was probably due to the large proportion of long-term dialysis patients compared with other units, which was significantly greater than in unit 2 ( $p > 0.001$ ). A significant correlation between length of time on dialysis and

**Table 3**  
B19V biomarkers among CKD patients attending three different Brazilian dialysis units during 2013–2015.

B19V biomarkers			Unit 1 n (%)	Unit 2n (%)	Unit 3n (%)	Totaln (%)
DNA+	IgM+	IgG+	0 (0)	5 (8.2)	20 (15.6)	25 (11.3)
DNA+	IgM+	IgG–	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)	2 (0.9)
DNA–	IgM+	IgG+	0 (0)	0 (0)	7 (5.5)	7 (3.2)
DNA+	IgM–	IgG–	0 (0)	6 (9.8)	23 (17.9)	29 (13.1)
DNA+	IgM–	IgG+	1 (3.1)	26 (42.6)	62 (48.5)	89 (40.3)
DNA–	IgM–	IgG+	24 (75.0)	19 (31.2)	11 (8.6)	54 (24.4)
DNA–	IgM–	IgG–	7 (21.9)	5 (8.2)	3 (2.3)	15 (6.8)
Total			32 (100)	61 (100)	128 (100)	221 (100)

B19V: parvovirus B19; IgM: immunoglobulin M; IgG: immunoglobulin G.

detection of B19V DNA has been reported in dialyzed patients from Iraq (Kadhom and Hussein, 2018).

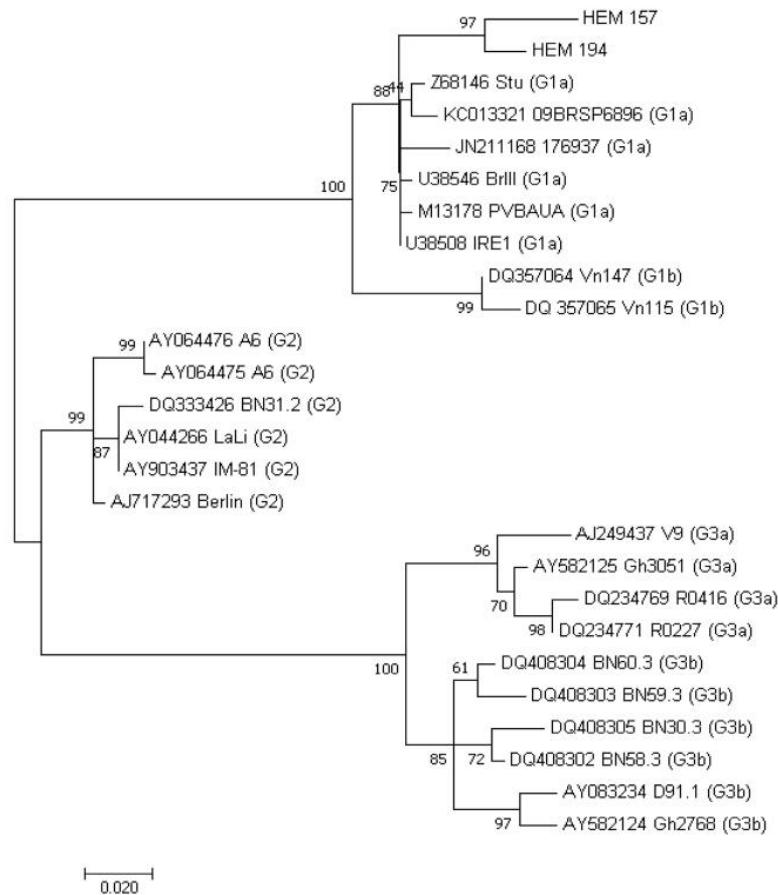
Another possible explanation for the lower B19V DNA prevalence in unit 1 (1%), compared with units 2 and 3, may be the period over which samples were collected. Samples from unit 1 were collected during January to February 2013, while those from units 2 and 3 were collected during 2014 and 2015, respectively. Previous studies conducted in Brazil have demonstrated that B19V has exhibited a cyclical pattern of occurrence every 4–5 years, characterized by years of high levels of infection, followed by a period of low incidence. During epidemic periods, the wide range

of clinical conditions associated with B19V infection may be diagnosed. Furthermore, the seasonal pattern of the infection in the northeast and southeast regions of the country showed a peak occurrence of B19V cases in the second half of the year—late winter and spring—with sporadic cases during the first half of the year (Cubel et al., 1996; Cubel et al., 1997; Cubel Garcia et al., 2017; Oliveira et al., 2008; Oliveira et al., 2002).

Two outbreaks of exanthematous illness and a case of fetal loss due to B19V infection were reported in Brazil during 2014–2015 (Di Paola et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Oliveira et al., 2019), coinciding with the period of sample collection at units 2 and 3 of this study. These findings could explain the high prevalence of B19V viremia found among these CKD patients. There is no epidemiological register of B19V outbreaks in the states of Rio de Janeiro and Ceará at the time of the study, because notification of B19V infection is not compulsory for epidemiological surveillance. However, the finding of B19V DNA in asymptomatic blood donors during 2015 in Rio de Janeiro corroborates the finding that 2015 was an epidemic year.

Few studies have been carried out worldwide on the detection of B19V DNA in patients under dialysis; most surveys have been focused on the prevalence of B19V in kidney transplant recipients (Rosado-Canto et al., 2019; Hai An et al., 2019; Baek et al., 2017).

Previous studies conducted in Iran found B19V DNA in 10% (5/50) of CKD patients (Sharif et al., 2016) and in 13.1% (13/99) of those infected with HIV (Azadmanesh et al., 2015). In a single Brazilian



**Figure 2.** Evolutionary history of B19V genotypes inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei + I model. All analysis were conducted in Mega X. The samples of this study were named by HEM prefix.



study, carried out in Minas Gerais state during 2012, B19V DNA was found in only 10 of 120 CKD patients (8.1%) (Alves et al., 2014). The higher prevalence of viremic patients in our study could be explained by the difference in sensitivity of the assays used to detect B19V DNA—quantitative PCR over conventional nested PCR. Another point to consider is that the earlier study was probably conducted in a period that did not include an epidemic year for B19V (Furtado et al., 2016).

Phylogenetic analysis revealed that two samples from unit 3 were clustered to genotype 1 and classified as genotype 1A. Genotype 1 is the most common in Brazil, with a frequency of 87.9% according to previous studies (Cubel Garcia et al., 2017; Di Paola et al., 2019; Figueiredo et al., 2019; Freitas et al., 2008; Pereira et al., 2014).

The mean viral load detected in CKD patients from all dialysis units was  $10^4$  IU/mL. As reported in previous studies, this mean viral load could be linked to a risk of B19V transmission through blood components (Molenaar-de Backer et al., 2016a; Molenaar-de Backer et al., 2016b; use Cfmpfh, 2012).

Among CKD patients who tested positive for B19V DNA ( $n = 145$ ) there were cases of acute infection, with concomitant detection of anti-B19V IgM in 27 patients, and no anti-B19V antibodies detected in 29 patients. This finding highlights the importance of combining serological and molecular assays for the accurate diagnosis of acute B19V infection. On the other hand, most patients with detectable B19V DNA were also positive for anti-B19V IgG (61.6%), suggesting persistent-B19V infection. This was probably due to a qualitative defect of antibodies in neutralizing the virus, since CKD patients usually have some degree of immunocompromised status due to their chronic uremic condition (Vaziri et al., 2012).

Persistent-B19V infection is an important finding in the pathogenesis of this virus, because many people may harbor the virus asymptomatically, but could pose an infection risk for certain groups, such as immunocompromised patients. Persistent infection is characterized by the presence of low viral load ( $\leq 10^4$  IU/mL) associated with the presence of anti-B19V IgG antibodies. Studies correlating B19V DNA, RNA, and proteins detected with some diseases—such as hepatitis, glomerulonephritis, and myocarditis—are limited and often contradictory (Adamson-Small et al., 2014; Söderlund-Venermo et al., 2002; Norja et al., 2006). However, the clinical significance of B19V infection in patients undergoing dialysis should be considered a potential risk in terms of the contamination of dialysis equipment and the subsequent threat to dialysis patients during transplantation procedures.

Two hypotheses are commonly used to explain persistent B19V infection: the persistence of the virus in different tissues, with prolonged release of virions, or at least B19V DNA; and the lack of neutralization of virions by the anti-B19V IgG antibody. The latter hypothesis was overturned by studies that demonstrated high levels of avidity and neutralization in antibodies directed against epitopes of the viral VP1 protein (Hourfar et al., 2011; Juhl et al., 2014). In addition, some data have demonstrated that prolonged persistence of B19V DNA would be the norm rather than the exception (Dodd, 2011).

The impact and role of parvovirus B19 infection in patients with chronic kidney disease are not known. Nevertheless, there are several reasons to think that parvovirus may be an important pathogen in these populations, since anemia is a common consequence of B19V infection and is also a predictable consequence of chronic renal insufficiency (Kazmi et al., 2001). Although the prevalence of severe anemia is high at the onset of dialysis, and the early presence of anemia in end-stage renal disease (ESRD) is associated with a greater rate of subsequent hospitalization and mortality (Ma et al., 1999), many studies have not found a significant association between anemia and B19V DNA detection in

dialysis patients (Guiseix et al., 1996; Sharif et al., 2016; Alves et al., 2014).

In our study, although anemia was found in 32% of CKD patients, we did not find a significant relationship between the presence of B19V viremia and anemia. However, anemia was significantly associated with B19V viremia in patients coinfecting with HBV or HCV (OR = 4.02, CI = 1.54–10.49,  $p = 0.003$ ), suggesting that coinfection of HBV/HCV with B19V might increase the risk of anemia. Recently, our group reported that coinfection of B19V and HBV increases the severity of disease (Alves et al., 2020). In addition, our experimental study confirmed erythroid hypoplasia in bone marrow from B19V and HAV coinfecting cynomolgus monkeys (*Macacca fascicularis*) (Leon et al., 2016). Therefore, the frequency of persistent B19V viremia with chronic anemia needs to be systematically evaluated in a larger cohort of anemic dialysis patients.

Our study found no correlation between time on dialysis, blood transfusion, age, or gender and B19V DNA detection. Although B19V DNA detection was higher in kidney-transplanted than in non-transplanted patients, this difference was not statistically significant. A possible explanation for higher detection of B19V DNA among kidney transplanted patients is that, after kidney transplantation, patients are required to take immunosuppressant medications to minimize the chance of organ rejection; this must continue for their entire lifetime. These medications can have significant side-effects, including increased risk of acquiring infectious diseases, such as parvovirus B19.

B19V DNA prevalence was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in patients under dialysis (65%) when compared with blood donors. Univariate logistic regression analyses demonstrated that being a CKD patient under dialysis was a risk factor for B19V infection. CKD patients undergoing dialysis therapy may have increased susceptibility to B19V infection for a range of reasons: their characteristic immune deficiency condition; routine exposure to dialysis procedures, which are invasive and therefore a potential risk for parenterally transmitted infections; and also the frequency of blood transfusion, which considering the mean viral load of  $10^4$  IU/mL observed in this study, could present a potential risk of transfusion-transmitted B19V (Waldman and Kopp, 2007; Waldman et al., 2008). Other studies on B19V and hemodialytic patients do not make the comparison with blood donors.

These data reinforce the importance of investigating B19V infection in this high-risk group, since persistent B19V infection in CKD patients could become clinically significant after renal transplant and after the introduction of immunosuppressant therapy. Moreover, persistent viremia should be considered a potential risk of spread of infection in enclosed dialysis units.

#### Funding sources

The Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ) funded this study. We are grateful for support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

#### Conflicts of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvements with any organization or entity with a financial interest in, or in financial conflict with, the subject matter or materials discussed in the manuscript, aside from those disclosed.

#### Ethical approval

The study protocol was approved by the ethics committee of the Oswaldo Cruz Institute (Protocol # 3.627.364).



## References

- Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci* 2007;4(2):105–9.
- Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG, Hobbs JA. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res* 2014;190:8–16.
- Alves ADR, Cubel Garcia RCN, Cruz OG, Pinto MA, Amado Leon LA. Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2019;19(3):259–66. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2019.1582333>.
- Alves MT, Vilaça SS, Godoi LC, Rezende Júnior L, Carvalho M, Silva FeS, et al. Parvovirus B19 (B19) and cytomegalovirus (CMV) infections and anti-erythropoietin (anti-EPO) antibodies in patients on dialysis hyporesponsive to erythropoietin therapy. *Clin Chim Acta* 2014;431:52–7.
- Alves ADR, Melgaço JG, Cubel Garcia RCN, Raposo JV, de Paula VS, Araújo CC, et al. Persistence of Parvovirus B19 in liver from transplanted patients with acute liver failure. *Future Microbiol* 2020;15:307–17.
- Azadmanesh K, Mohraz M, Kazemimanesht M, Aghakhani A, Foroughi M, Banifazl M, et al. Frequency and genotype of human parvovirus B19 among Iranian patients infected with HIV. *J Med Virol* 2015;87(7):1124–9.
- Baek CH, Kim H, Yang WS, Han DJ, Park SK. Risk factors and long-term outcomes of parvovirus B19 infection in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis* 2017;19(5).
- Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, et al. ICTV virus taxonomy profile: parvoviridae. *J Gen Virol* 2019;100(3):367–8.
- Cubel RC, Garcia AG, Pegado CS, Ramos HI, Fonseca ME, Clewley JP, et al. Human parvovirus B19 infection and hydrops fetalis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91(2):147–51.
- Cubel RC, Siqueira MM, Santos EO, Pires MF, Cruz CM, Nascimento JP. Human parvovirus B19 infections among exanthematic diseases notified as measles. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30(1):15–20.
- Cubel Garcia RC, Pereira RF, Azevedo KM, Castro TX, Mello FC, Setubal S, et al. Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2017;21(1):102–6.
- Di Paola N, Mesquita FS, Oliveira DBL, Villabona-Arenas CJ, Zaki Pour S, de Sousa-Capra C, et al. An outbreak of human parvovirus B19 hidden by dengue fever. *Clin Infect Dis* 2019;68(5):810–7.
- Dodd RY. B19: benign or not?. *Transfusion* 2011;51(9):1878–9.
- Duranay M, Bali M, Sahin M, Yakinci C, Vurgun N, Dilmen U. Parvovirus B19 infection and unresponsiveness to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(3):779–80.
- Eid AJ, Chen SF, Practice AIDCo. Human parvovirus B19 in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:201–5.
- Figueiredo RMP, Souza VC, Nascimento VAD, Naveca FG. Human parvovirus B19 genotype 1 in suspected dengue patients of Tefé, Amazonas State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019;52:e20190304.
- Freitas RB, Melo FL, Oliveira DS, Romano CM, Freitas MR, Macêdo O, et al. Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. *J Clin Virol* 2008;43(1):60–5.
- Furtado Mo S, Martins ML, de Figueiredo RM, Viana MB. Transient red cell aplasia in two brothers with sickle cell anemia and erythrovirus B19 infection. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38(3):271–3.
- Gallinella G. The clinical use of parvovirus B19 assays: recent advances. *Expert Rev Mol Diagn* 2018;18(9):821–32.
- Guiserix J, Ramdane M, Hoarau JM, Finielz P, Michault A. Parvovirus B19 and hemodialysis. *Nephron* 1996;72(4):719.
- Hai An HP, Diem HT, Cuong NT. Parvovirus B19-associated anemia in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc* 2019;51(8):2693–6.
- Hourfar MK, Mayr-Wohlfart U, Themann A, Sireis W, Seifried E, Schrezenmeier H, et al. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products. *Transfusion* 2011;51(1):129–36.
- Juhl D, Görg S, Hennig H. Persistence of parvovirus B19 (B19V) DNA and humoral immune response in B19V-infected blood donors. *Vox Sang* 2014;107(3):226–32.
- Kadhom SH, Hussein AA. Infection rate of human parvovirus B19 among Hemodialysis patients in Bequeath City. *IOSR J Pharm Biol Sci* 2018;13(4):76–81.
- Kazmi WH, Kausz AT, Khan S, Abichandani R, Ruthazer R, Obrador GT, et al. Anemia: an early complication of chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4):803–12.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35(6):1547–9.
- Leon LA, Marchevsky RS, Gaspar AM, Garcia ReC, Almeida AJ, Pelajo-Machado M, et al. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;111(4):258–66.
- Ma JZ, Ebben J, Xia H, Collins AJ. Hematocrit level and associated mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(3):610–9.
- Molenaar-de Backer MW, Russcher A, Kroes AC, Koppelman MH, Lanfermeijer M, Zaaier HL. Detection of parvovirus B19 DNA in blood: viruses or DNA remnants?. *J Clin Virol* 2016a;84:19–23.
- Molenaar-de Backer MW, de Waal M, Sjerps MC, Koppelman MH. Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. *Transfusion* 2016b;56(2):440–8.
- Naqvi SB, Collins AJ. Infectious complications in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006;13(3):199–204.
- Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(19):7450–3.
- Oliveira SA, Camacho LA, Pereira AC, Faillace TF, Setubal S, Nascimento JP. Clinical and epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection in an urban area in Brazil (Niterói city area, State of Rio de Janeiro, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(7):965–70.
- Oliveira MJ, Cordeiro MT, Costa FM, Murakami G, Silva AM, Travassos RC, et al. [Frequency of measles, rubella, dengue and erythema infectiosum among suspected cases of measles and rubella in the State of Pernambuco between 2001 and 2004]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(4):338–44.
- Oliveira GM, Pascoal-Xavier MA, Moreira DR, Guimarães VS, Aguiar R, Miranda DM, et al. Detection of cytomegalovirus, herpes virus simplex, and parvovirus b19 in spontaneous abortion placentas. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;32(5):768–75.
- Ozeki M, Fukushima T, Ohzeki M, Sasaki T, Kashiwara N. A nosocomial parvovirus B19 infection-induced transient aplastic crisis in a patient with chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2006;65(2):141–3.
- Pereira RF, Garcia ReC, Azevedo KM, Setúbal S, Siqueira MA, Oliveira SA. Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109(2):168–73.
- Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human parvoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2017;30(1):43–113.
- Ribeiro Barbosa J, Sousa Bezerra C, Carvalho-Costa FA, Pimentel de Azevedo C, Lopes Flores G, Baima Colares JK, et al. Cross-sectional study to determine the prevalence of hepatitis B and C virus infection in high risk groups in the Northeast Region of Brazil. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14.
- Rosado-Canto R, Carrillo-Pérez DL, Jiménez JV, Cuellar-Rodríguez J, Parra-Avila I, Alberú J, et al. Treatment strategies and outcome of parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients: a case series and literature review of 128 patients. *Rev Invest Clin* 2019;71(4):265–74.
- Sharif A, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Sharif MR, Razeghi E, et al. Frequency and genotype of human parvovirus B19 among Iranian hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Intervirology* 2016;59(3):179–85.
- Söderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol Biol (Paris)* 2002;50(5):307–16.
- EMA. In: Agency EM, editor. Guideline on Plasma-Derived Medicinal Products. European Union: European Medicines Agency; 2012. p. 1–33.
- Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr* 2012;22(1):149–56.
- Waldman M, Kopp JB. Parvovirus B19 and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2 Suppl 1:S47–56.
- Waldman M, Marshall V, Whitby D, Kopp JB. Viruses and kidney disease: beyond HIV. *Semin Nephrol* 2008;28(6):595–607.
- Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. *Lancet* 2017;389(10075):1238–52.
- WHO. In: Organization World Health, editor. Haemoglobin Concentrations for the Diagnosis of Anaemia and Assessment of Severity. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. p. 1–6.

### 3.5 Diagnóstico diferencial de Parvovirus B19 para doenças exantemáticas e febris agudas

**Título:** *Beyond arboviruses: a multicenter study to evaluate differential diagnosis of rash diseases and acute febrile illness cases in Rio de Janeiro, Brazil*

**Autores:** Arthur Daniel Rocha Alves, Jéssica Vasques Raposo, Rafaela Moraes Pereira de Sousa, Claudete Aparecida Araújo Cardoso, Pâmela Karla Simões de Freitas Costa, Julienne Martins Araújo, Sabrina Teresinha Alvim Barreiro, Clarisse da Silveira Bressan, Guilherme Amaral Calvet, Rogério Valls de Souza, Patrícia Brasil, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Marcelo Alves Pinto, Vanessa Salete de Paula, Luciane Almeida Amado.

**Revista:** Submetido ao periódico *PlosOne* (Fator de impacto = 2.776 e Qualis para Medicina 2 = A2).

**Resumo:** Uma grande variedade de vírus pode causar doenças exantemáticas (DE) ou doença febril aguda (DFA) em crianças, adolescentes e adultos. Entretanto, cerca de 19% dos casos de DE e 40% dos casos de DFA permanecem sem etiologia definida. A infecção por Parvovírus B19 (B19V) e Herpesvírus também podem causar DE e/ou DFA, e em alguns grupos de risco essas infecções podem se tornar persistentes (ou latentes) e podem exigir tratamento hospitalar. Como essas infecções não são de notificação obrigatória, podem ser ocultadas por outras doenças, como as causadas por arboviroses (por exemplo, Dengue). Nesse contexto, o objetivo do estudo foi realizar o diagnóstico laboratorial diferencial das infecções por B19V e Herpesvírus em pacientes com DE e DFA, sem etiologia definida, atendidos em hospitais e/ou centros de referência em doenças infecciosas do Rio de Janeiro. Participaram do estudo 114 participantes, 54 crianças e 60 adultos. A infecção por B19V foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) e ELISA (anticorpos IgM e IgG anti-B19V). O EBV foi avaliado por qPCR e Betaherpesvírus (HCMV, HHV-6 e HHV-7) por meio de qPCR multiplex. Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos a partir dos prontuários desses participantes. A idade mediana e interquartil (IQR) das crianças com DE foi de 2 anos (IQR: 5) e 55,6% eram do sexo masculino, enquanto entre os adultos com DFA foi de 38 anos (IQR: 21) e 56,7% eram do sexo feminino.

Em relação aos pacientes com DE, a prevalência (e carga) viral foi de 5,5%(10<sup>4</sup>UI/mL), 3,4%(10<sup>4</sup>UI/mL), 5,5%(10<sup>4</sup>UI/mL) e 11,1%(10<sup>5</sup>UI/mL) para B19V, EBV, HCMV e HHV-6, respectivamente, e em pacientes com DFA foram 6,6%(10<sup>5</sup>UI/mL), 1,6%(10<sup>3</sup>UI/mL), 3,3%(10<sup>4</sup>UI/mL) para B19V, HCMV e HHV-6, respectivamente. HHV-7 não foi detectado em pacientes com DE ou DFA. Esses resultados sugerem a importância da inclusão de B19V e Herpesvírus no diagnóstico laboratorial diferencial em pacientes com DE e DFA, não apenas para fins epidemiológicos, mas também para o manejo adequado do paciente.



## PLOS ONE

## BEYOND ARBOVIRUSES: A MULTICENTER STUDY TO EVALUATE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RASH DISEASES AND ACUTE FEBRILE ILLNESS CASES IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-21-35138
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	BEYOND ARBOVIRUSES: A MULTICENTER STUDY TO EVALUATE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RASH DISEASES AND ACUTE FEBRILE ILLNESS CASES IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL
<b>Short Title:</b>	MULTICENTER STUDY TO EVALUATE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RASH DISEASES AND ACUTE FEBRILE ILLNESS CASES
<b>Corresponding Author:</b>	Vanessa Saete de Paula FIOCRUZ: Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
<b>Keywords:</b>	Acute febrile illness; rash diseases; Parvovirus B19; Herpesvirus; Prevalence
<b>Abstract:</b>	<p><b>Introduction:</b> A wide variety of viruses can cause rash diseases (RD) or acute febrile illness (AFI) in children, adolescents and in adults, however, about 19% of RD cases and 40% of AFI cases remain without a defined etiology. Parvovirus B19 (B19V) and Herpesviruses infection can also cause RD and/or AFI, and in some risk groups these infections can become persistent (or latent) and may require hospital treatment. Since these infections are not of mandatory notification, they can be hidden by other diseases, such as caused by arboviruses ( e.g., Dengue). In this context, the aim of this study was to carry out the differential laboratory diagnosis of B19V and Herpesviruses infections in patients with RD and AFI, without defined etiology, seen in hospitals and/or reference centers for infectious diseases in Rio de Janeiro.</p> <p><b>Methods:</b> A total of 114 participants were enrolled in the study, 54 children and 60 adults. B19V infection was assessed by real-time PCR (qPCR) and ELISA (anti-B19V IgM and IgG). EBV was assessed through qPCR and Betaherpesviruses (HCMV, HHV-6 and HHV-7) through multiplex qPCR. Sociodemographic and clinical data were obtained from medical record data of these participants.</p> <p><b>Results:</b> The median and interquartile range (IQR) age of children with RD was 2 years (IQR: 5) and 55.6% were male, while among adults with AFI it was 38 years (IQR: 21) and 56.7% were female. Regarding RD patients, viral prevalence (and load) were 5.5%(10<sup>4</sup> IU/mL), 3.4%(10<sup>4</sup> IU/mL), 5.5%(10<sup>4</sup> IU/mL) and 11.1%(10<sup>5</sup> IU/mL) for B19V, EBV, HCMV and HHV-6 infection, respectively, and in AFI patients were 6.6%(10<sup>5</sup> IU/mL), 1.6%(10<sup>3</sup> IU/mL), 3.3%(10<sup>4</sup> IU/mL) for B19V, HCMV and HHV-6, respectively. HHV-7 was not detected RD or AFI patients.</p> <p><b>Conclusion:</b> These results suggest the importance of including B19V and Herpesviruses in the differential laboratory diagnosis in patients with RD and AFI, not only for epidemiological purposes, but also for the proper management of the patient.</p>
<b>Order of Authors:</b>	Arthur Daniel Rocha Alves Jessica Vasques Raposo Rafaela Moraes Pereira de Sousa Claudete Aparecida Araujo Cardoso Pâmela Karla Simões de Freitas Costa Julienne Martins Araújo Sabrina Teresinha Alvim Barreiro Clarisse da Silveira Bressan Guilherme Amaral Calvet Rogério Valls de Souza

	Patrícia Brasil Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia Marcelo Alves Pinto Vanessa Salete de Paula Luciane Almeida Amado
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<p><b>Financial Disclosure</b></p> <p>Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the <a href="#">submission guidelines</a> for detailed requirements. View published research articles from <a href="#">PLOS ONE</a> for specific examples.</p> <p>This statement is required for submission and <b>will appear in the published article</b> if the submission is accepted. Please make sure it is accurate.</p> <p><b>Unfunded studies</b>                  Enter: <i>The author(s) received no specific funding for this work.</i></p> <p><b>Funded studies</b>                  Enter a statement with the following details:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Initials of the authors who received each award</li> <li>• Grant numbers awarded to each author</li> <li>• The full name of each funder</li> <li>• URL of each funder website</li> <li>• Did the sponsors or funders play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript?</li> <li>• <b>NO</b> - Include this sentence at the end of your statement: <i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i></li> <li>• <b>YES</b> - Specify the role(s) played.</li> </ul> <p>* typeset</p>	The author(s) received no specific funding for this work
<p><b>Competing Interests</b></p> <p>Use the instructions below to enter a</p>	The authors have declared that no competing interests exist

<p>competing interest statement for this submission. On behalf of all authors, disclose any <a href="#">competing interests</a> that could be perceived to bias this work—acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>This statement is <b>required</b> for submission and <b>will appear in the published article</b> if the submission is accepted. Please make sure it is accurate and that any funding sources listed in your Funding Information later in the submission form are also declared in your Financial Disclosure statement.</p> <p>View published research articles from <a href="#">PLOS ONE</a> for specific examples.</p> <p><b>NO authors have competing interests</b></p> <p>Enter: <i>The authors have declared that no competing interests exist.</i></p> <p><b>Authors with competing interests</b></p> <p>Enter competing interest details beginning with this statement:</p> <p><i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: [insert competing interests here]</i></p> <p>* typeset</p>	
<p><b>Ethics Statement</b></p> <p>Enter an ethics statement for this submission. This statement is required if the study involved:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Human participants</li> <li>• Human specimens or tissue</li> <li>• Vertebrate animals or cephalopods</li> <li>• Vertebrate embryos or tissues</li> <li>• Field research</li> </ul>	<p>The study protocol was approved by the Ethics Committee of Oswaldo Cruz Institute (Protocols #2.498.339 and # 3.627.364) as well as by all partnering health units. Parents or guardians of patients under 18 years of age provided written informed consent. Patients aged 18 years and over provided written informed consent; patients aged 7–17 years provided written assent to participate.</p>



Write "N/A" if the submission does not require an ethics statement.

General guidance is provided below.

Consult the [submission guidelines](#) for detailed instructions. **Make sure that all information entered here is included in the Methods section of the manuscript.**

#### Format for specific study types

##### Human Subject Research (Involving human participants and/or tissue)

- Give the name of the institutional review board or ethics committee that approved the study
- Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research
- Indicate the form of consent obtained (written/oral) or the reason that consent was not obtained (e.g. the data were analyzed anonymously)

##### Animal Research (Involving vertebrate animals, embryos or tissues)

- Provide the name of the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board that reviewed the study protocol, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval
- Include an approval number if one was obtained
- If the study involved *non-human primates*, add *additional details* about animal welfare and steps taken to ameliorate suffering
- If anesthesia, euthanasia, or any kind of animal sacrifice is part of the study, include briefly which substances and/or methods were applied

##### Field Research

Include the following details if this study involves the collection of plant, animal, or other materials from a natural setting:

- Field permit number
- Name of the institution or relevant body that granted permission

<p><b>Data Availability</b></p> <p>Authors are required to make all data underlying the findings described fully available, without restriction, and from the time of publication. PLOS allows rare exceptions to address legal and ethical concerns. See the <a href="#">PLOS Data Policy</a> and <a href="#">FAQ</a> for detailed information.</p> <p>A Data Availability Statement describing where the data can be found is required at submission. Your answers to this question constitute the Data Availability Statement and <b>will be published in the article</b>, if accepted.</p> <p><b>Important:</b> Stating 'data available on request from the author' is not sufficient. If your data are only available upon request, select 'No' for the first question and explain your exceptional situation in the text box.</p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p><b>Describe where the data may be found in full sentences. If you are copying our sample text, replace any instances of XXX with the appropriate details.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• If the data are <b>held or will be held in a public repository</b>, include URLs, accession numbers or DOIs. If this information will only be available after acceptance, indicate this by ticking the box below. For example: <i>All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX).</i></li> <li>• If the data are all contained <b>within the manuscript and/or Supporting Information files</b>, enter the following: <i>All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.</i></li> <li>• If neither of these applies but you are able to provide <b>details of access elsewhere</b>, with or without limitations, please do so. For example:</li> </ul>	<p>All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files</p>

<p><i>Data cannot be shared publicly because of [XXX]. Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee (contact via XXX) for researchers who meet the criteria for access to confidential data.</i></p> <p><i>The data underlying the results presented in the study are available from (include the name of the third party and contact information or URL).</i></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• This text is appropriate if the data are owned by a third party and authors do not have permission to share the data.</li></ul> <p>* typeset</p>	
Additional data availability information:	

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

*Original full article*

**BEYOND ARBOVIRUSES: A MULTICENTER STUDY TO EVALUATE  
DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RASH DISEASES AND ACUTE FEBRILE  
ILLNESS CASES IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL**

Arthur Daniel Rocha Alves<sup>1</sup>; Jéssica Vasques Raposo<sup>2</sup>; Rafaela Moraes Pereira de Sousa<sup>2</sup>; Claudete Aparecida Araújo Cardoso<sup>3</sup>; Pâmela Karla Simões de Freitas Costa<sup>4</sup>; Julienne Martins Araújo<sup>4</sup>; Sabrina Teresinha Alvim Barreiro<sup>4</sup>; Clarisse da Silveira Bressan<sup>5</sup>; Guilherme Amaral Calvet<sup>5</sup>; Rogério Valls de Souza<sup>5</sup>; Patrícia Brasil<sup>5</sup>; Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia<sup>6</sup>; Marcelo Alves Pinto<sup>1</sup>; Vanessa Salete de Paula<sup>2\*</sup>; Luciane Almeida Amado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Departamento Materno Infantil, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

<sup>4</sup> Hospital Getúlio Vargas Filho, Secretaria Municipal de Saúde, Niterói, RJ, Brasil

<sup>5</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>6</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

\* Correspondence author: Vanessa Salete de Paula (vdepaula@ioc.fiocruz.br), +55(21)2562-1900



26

27 **Abstract**

28

29 **Introduction:** A wide variety of viruses can cause rash diseases (RD) or acute  
30 febrile illness (AFI) in children, adolescents and in adults, however, about 19% of  
31 RD cases and 40% of AFI cases remain without a defined etiology. Parvovirus  
32 B19 (B19V) and Herpesviruses infection can also cause RD and/or AFI, and in  
33 some risk groups these infections can become persistent (or latent) and may  
34 require hospital treatment. Since these infections are not of mandatory  
35 notification, they can be hidden by other diseases, such as caused by arboviruses  
36 (e.g., Dengue virus). In this context, the aim of this study was to carry out the  
37 differential laboratory diagnosis of B19V and Herpesviruses infections in patients  
38 with RD and AFI, without defined etiology, seen in hospitals and/or reference  
39 centers for infectious diseases in Rio de Janeiro.

40 **Methods:** A total of 114 participants were enrolled in the study, 54 children and  
41 60 adults. B19V infection was assessed by real-time PCR (qPCR) and ELISA  
42 (anti-B19V IgM and IgG). EBV was assessed through qPCR and  
43 Betaherpesviruses (HCMV, HHV-6 and HHV-7) through multiplex qPCR.  
44 Sociodemographic and clinical data were obtained from medical record data of  
45 these participants.

46 **Results:** The median and interquartile range (IQR) age of children with RD was  
47 2 years (IQR: 5) and 55.6% were male, while among adults with AFI it was 38  
48 years (IQR: 21) and 56.7% were female. Regarding RD patients, viral prevalence  
49 (and load) were 5.5%(10<sup>4</sup>IU/mL), 3.4%(10<sup>4</sup>IU/mL), 5.5%(10<sup>4</sup>IU/mL) and  
50 11.1%(10<sup>5</sup>IU/mL) for B19V, EBV, HCMV and HHV-6 infection, respectively, and

2

51 in AFI patients were 6.6%(10<sup>5</sup>IU/mL), 1.6%(10<sup>3</sup>IU/mL), 3.3%(10<sup>4</sup>IU/mL) for B19V,  
52 HCMV and HHV-6, respectively. HHV-7 was not detected RD or AFI patients.

53 **Conclusion:** These results suggest the importance of including B19V and  
54 Herpesviruses in the differential laboratory diagnosis in patients with RD and AFI,  
55 not only for epidemiological purposes, but also for the proper management of the  
56 patient.

57

58 **Keywords:** Acute febrile illness; rash diseases; Parvovirus B19; Herpesvirus;  
59 Prevalence

60

## 61 **Introduction**

62

63 A wide variety of viruses share the ability to cause rashes, that can be  
64 localized or disseminated in skin, associated or not with exanthema, fever,  
65 malaise, pruritus and other systemic signs and symptoms [1]. The so-called viral  
66 Rash Diseases (RD) are extremely common in Brazil and constitute a serious  
67 public health problem, as they are usually the main cause of seeking medical  
68 care in hospitals and pediatric clinics. However, there are several difficulties in  
69 determining an accurate etiological diagnosis, especially if the etiological  
70 identification occurs exclusively on clinical examination [2-5].

71 The most common etiological agents for RD include Measles virus,  
72 Rubella virus, Dengue virus, Chickenpox virus, Cytomegalovirus, Epstein Barr  
73 virus, Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7, Enterovirus, Human  
74 Parvovirus B19, Chikungunya virus and Zika virus [3, 4]. Since, most of these  
75 infectious agents share many clinical manifestations, the etiological diagnosis of

76 RD is of paramount importance, not only for guide the treatment of choice, but  
77 also for epidemiological purposes, as controlling and eradication of infections.

78 Acute febrile illnesses (AFI) may or may not be associated with the  
79 presence of skin rash. AFI is characterized by fever lasting less than seven days  
80 without identifying a bacterial source [6, 7]. Fever is a common reason for seeking  
81 health care in Latin America, associated with substantial morbidity and mortality  
82 [8]. A typical feature of many infectious and non-infectious diseases, the  
83 etiological diagnosis of fever represents a considerable challenge for healthcare  
84 professionals and surveillance systems, especially when confirmatory tests are  
85 not available at the place of care [9]. Environmental conditions, socioeconomic  
86 factors and availability of vaccines are some of the factors that influence the  
87 incidence and etiology of febrile infectious diseases in the region.

88 A recently published review on the epidemiology of AFI in Latin America,  
89 showed that between 2007-2016, in the city of Rio de Janeiro, 40% of cases of  
90 AFI did not have a defined etiology, which highlights an important gap in current  
91 knowledge that should be addressed to improve the understanding of AFI in the  
92 region [10].

93 In the Brazilian epidemiological scenario, where several emerging and  
94 reemerging viruses co-circulate, such as the Dengue, Chikungunya and Zika  
95 viruses, together with the increasing trends of measles cases, demand the due  
96 attention of public health agencies [11]. According to currently Brazilian  
97 epidemiological bulletin, the incidence of Dengue and Chikungunya varies from  
98 moderate to high depending on the state, with an overall incidence in the country  
99 of 726 cases per 100,000 inhabitants and 62 cases per 100,000 inhabitants,  
100 respectively. In addition cases of zika virus are still reported, reflecting an overall

101 incidence of 5.1 cases per 100,000 inhabitants [12]. These data demonstrate the  
102 high investigation and incidence of arboviruses in Brazil, that could hide other  
103 infections, as has being demonstrated by Di Paola and collaborators [13].

104         The investigation of RD and fever illness etiologies other than those  
105 emergence pathogens are needed and would probably reveal a higher burden of  
106 neglected pathogens, such as Parvovirus B19 and Herpesviruses  
107 (Cytomegalovirus, Epstein Barr, Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7).  
108 These infections have been underestimated and underdiagnosed [13], and  
109 although represent in most cases benign and self-limited diseases, in some  
110 cases there is a risk of progressing to a more serious clinical course [14-16].

111         Parvovirus B19 usually causes a common childhood RD known as  
112 erythema infectiosum (EI), arthropathy in adults and aplastic crisis in patients with  
113 hemolytic diseases. In immunocompromised patients, B19V infection is not  
114 readily cleared, and its long persistence leads to chronic anemia. During  
115 pregnancy, adverse outcome as severe fetal anemia and hydrops fetalis can  
116 occur [17]. About 19% of RD cases remain without a confirmatory diagnosis and  
117 among cases with defined etiology, infection by human Parvovirus B19 is the  
118 main cause (33%), demonstrating the need to perform specific laboratory  
119 diagnosis (8).

120         In Brazil, the epidemiological scenario of B19V was recently reviewed [18],  
121 and we could observe that the period of study is from 1987 to 2016 in specific  
122 states of the country and varies from 2% (Pará state in 1987) to 63.2% (São  
123 Paulo state in 2013-2014). So, there are no epidemiological efforts to present the  
124 real dynamics of this infection in Brazil in current years.

125 Infections caused by Herpesviruses are also often asymptomatic, benign,  
126 and self-limited, and the ability to remain in latency in the host is an intrinsic  
127 characteristic of all members of the Herpesviridae family. In line with viral latency,  
128 greater severity and reactivations of herpetic infections are expected in  
129 immunosuppressed patients, in specific age groups such as childhood and  
130 senility, as well as during pregnancy. In severe and untreated cases, Herpesvirus  
131 infections can lead to death. Even though most of these infections have a benign  
132 and self-limited course, for certain age groups, pregnant and  
133 immunocompromised patients, it could represent an important risk, as they can  
134 progress to severe diseases, which may require specific treatment and  
135 emergency hospitalization, burdening the public service health [19]. Therefore,  
136 investigation of B19 and Herpesviruses as differential diagnosis of RD and fever  
137 illness is of great importance to ensure an adequate treatment of the patient, for  
138 improving the surveillance systems of these infections, which include  
139 implementation of diagnostic tools and establishing of the measures for these  
140 diseases control.

141 Thus, the aim of this study was to carry out the differential diagnosis of  
142 Parvovirus (B19V) and Herpesvirus (CMV, EBV, HHV-6 and 7) among individuals  
143 with RD and AFI, without defined etiology, to identify their prevalence and clinical  
144 characteristics, aiming to contribute for understanding of RD and AFI fever  
145 epidemiology seen in hospitals and/or reference centers for infectious diseases  
146 in Rio de Janeiro, Brazil.

147

## 148 **Materials and methods**

149



## 150 **Study population and ethical aspects**

151           From December 2018 to October 2019, children and adolescents aged  
152 between 0 and 18 years, attended at Hospital Getúlio Vargas Filho (HGVF) and  
153 at Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) (Niterói, RJ), with RD were  
154 invited to participate in this study. Entry criteria of RD disease included a macular,  
155 maculopapular, papular, urticarial, or vesicular diffuse cutaneous eruption  
156 commonly accompanied by prodromal systemic clinical manifestations such as  
157 fever and malaise, besides respiratory or gastrointestinal signals and symptoms.  
158 All the participants had less than 10 days of symptom onset.

159           From May 2018 to October 2019, adult patients with AFI treated at the  
160 Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) (Rio de Janeiro, RJ) were  
161 invited to participate in the study. Inclusion criteria were men and women aged  
162  $\geq 18$  years that had developed acute fever with or without a rash, and no evident  
163 focus of infection within the previous seven days. We defined fever as an axillary  
164 temperature of  $\geq 37.5$  °C. During the study period, 330 patients presenting RD  
165 and/or AFI were attended at HGVF, HUAP and INI, and out of these, 216 (65.5%)  
166 had at least one type of the arboviruses detectable by molecular methods  
167 (Dengue virus, Yellow fever virus, Zika virus and/or Chikungunya virus).  
168 Chikungunya was the arbovirus responsible for most (88%) of the RD or AFI  
169 cases, while 34.7% of the RD and AFI cases had no defined etiology. Only  
170 patients without defined etiology for RD or AFI were included in this study.

171           All patients with RD or AFI who had acute B19V infection diagnosed at this  
172 present work were followed up to evaluate the outcomes of the infection. At the  
173 time of the interview, the signs and symptoms of the patients were reported. To  
174 maintain the same routine of follow-up and return of patients in each hospital,

175 these patients were monitored as follows: Patients attended at HGVF and HUAP  
176 were followed for 6 months, with consecutive serum samples collected at 1  
177 month, 3 months and 6 months after the initial collection; patients attended at INI  
178 were followed for 2 months with consecutive serum samples collected at 1 week,  
179 1 month and 2 months after the initial collection. One AFI patient attended at INI  
180 did not return for subsequent sample collections of the present study.

181 The study protocol was approved by the Ethics Committee of Oswaldo  
182 Cruz Institute (Protocols #2.498.339 and # 3.627.364) as well as by all partnering  
183 health units. Parents or guardians of patients under 18 years of age provided  
184 written informed consent. Patients aged 18 years and over provided written  
185 informed consent; patients aged 7–17 years provided written assent to  
186 participate.

187

## 188 **Molecular and serologic tests for B19V**

189 B19V infection was investigated in the serum samples collected at the day  
190 of the medical appointment after the consent signature by the patient, through  
191 serological and molecular assays.

192 For molecular detection and quantification of B19V, DNA was extracted  
193 from sera samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden,  
194 Germany). Real-time PCR was carried out using the TaqMan system (Applied  
195 Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA), as  
196 described by Alves and collaborators [20].

197 To find out whether B19V DNA positive patients had acute or persistent  
198 infection, all serum samples positive for B19V DNA were investigated to the  
199 presence of anti-B19V IgM and IgG antibodies, through enzyme-linked

200 immunosorbent assay (VirionSerion, Brazil), according to the manufacturer's  
201 instructions.

202 For B19V genotyping, a nested PCR [21] using the primer pairs VP1/VP1R  
203 (nt 3502–3883, GenBank: NC\_000883.2) and VP2/VP2R (nt 3541–3867,  
204 GenBank: NC\_000883.2) were performed to amplify the 326bp fragment of the  
205 VP1/VP2 capsid gene. The Nested-PCR products were purified using the  
206 QIAquick gel extraction (Qiagen, Germany) and then sequenced directly using  
207 the BigDye terminator v. 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and  
208 an ABI Prism® 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, USA). Both strands of  
209 each amplicon were sequenced.

210 For phylogenetic analysis, sequences were aligned using the BioEdit  
211 Sequence Alignment Editor v. 7.2.5. A Maximum likelihood tree was constructed  
212 based on Tamura-Nei+G+I model, and inferred using a bootstrap consensus tree  
213 from 1000 replicates, available in the MEGA v. X software [22]. The B19V  
214 genotype was determined by including reference sequences of genotypes 1A,  
215 1B, 2, 3A and 3B available in Genbank. To root the tree a sequence from Human  
216 Bocavirus available in Genbank was used.

217

## 218 **Molecular tests for Herpesviruses**

219 Herpesvirus infection was also investigated in the serum samples, after  
220 the DNA extraction using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden,  
221 Germany). EBV was detected and quantified through real-time PCR (qPCR) [23]  
222 and Betaherpesviruses (HCMV, HHV-6 and HHV-7) through multiplex qPCR [24].  
223 For amplification of HCMV, HHV-6 and HHV-7, specific probes and  
224 oligonucleotides were used for the UL54 region (referring to DNA synthesis, with

225 130bp), U56 region (referring to the viral capsid, with 150 bp) and for the U37  
226 region (referring to the tegument of the virus, with 312 bp), respectively. The  
227 detection and quantification of EBV was performed by qPCR monoplex, using  
228 oligonucleotides and probe for the target region EBNA-1, referring to the nuclear  
229 antigen EB (100 bp). All qPCR (monoplex and multiplex) procedures were made  
230 using the TaqMan system (AgPath-ID PCR, Life Technologies, Carlsbad, USA).  
231

## 232 **Statistical analysis**

233 Statistical analysis was conducted using R studio (version 1.2.1335,  
234 Boston, USA). Continuous variables were expressed as mean (or median, when  
235 applicable) and were compared with the Mann-Whitney U test. Categorical  
236 variables were expressed as number (%) and Chi-square test or Fisher exact test  
237 was used. Odds ratio (OR) for virus detection in RD and/or AFI patients was  
238 analyzed with univariate logistic regression. All P values were two-sided, and  
239 those < 0.05 were considered as statistically significant.

240

## 241 **Results**

242

### 243 **Characterization of the studied population**

244 During the period of this study, 54 children with RD with undefined etiology  
245 were included. Their median age was 6 years with an interquartile range (IQR) of  
246 5 years and 55.6% were male (Table 1).

247

248 **Table 1:** Demographical, clinical and laboratorial findings among children and  
249 adolescents with rash diseases (RD)

Parameter	Parvovirus B19		Cytomegalovirus		Epstein-Barr		Herpesvirus 6		Total (n = 54)
	B19V+ (n = 3)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	hCMV+ (n = 3)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	EBV+ (n = 2)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	HHV-6+ (n = 6)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	
Gender									
Male n(%)	2 (66.7)	0.69; 1.64 (0.14- 19.28)	2 (66.7)	0.69; 1.64 (0.14- 19.28)	2 (100)	0.35; 4.29 (0.19- 93.90)	3 (50)	0.77; 0.77 (0.14- 4.25)	30 (55.6)
Female n(%)	1 (33.3)		1 (33.3)		0 (0)		3 (50)		24 (44.4)
Age group (years)									
≤ 2 n(%)	1 (33.3)	0.44; 0.38 (0.03- 4.46)	2 (66.7)	0.69; 1.64 (0.14- 19.28)	1 (50)	0.87; 0.79 (0.04- 13.37)	6 (100)	0.08; 13.0 (0.69- 243.58)	30 (55.6)
> 2 n(%)	2 (66.7)		1 (33.3)		1 (50)		0 (0)		24 (44.4)
Median age; range	6y; 9m-7y	0.73; NA	1y; 9m-7y	0.82; NA	4y; 2y- 6y	0.39; NA	10m; 6m-1y	0.49; NA	2y; 6m- 15y
Race / ethnicity									
White n(%)	1 (33.3)	0.51; 0.44 (0.04- 5.22)	1 (33.3)	0.51; 0.44 (0.04- 5.22)	2 (100)	0.31; 5.0 (0.23- 109.21)	4 (66.7)	0.47; 1.91 (0.31- 11.49)	28 (52.0)
Black n(%)	2 (66.7)		2 (66.7)		0 (0)		2 (33.3)		24 (44.4)
Asian n(%)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (1.8)
Weight (Kg) Mean±SD	13.3±1 1.3	0.52; NA	9.4±7. 7	0.64; NA	12.2±8 .5	0.79; NA	7.8±3. 5	0.15; NA	17.2±1 0.5
Height (cm) Mean±SD	111.5± 16.3	0.64; NA	64.0±4 6.1	0.07; NA	108.5± 14.8	0.75; NA	73.5±5 .1	<b>0.02; NA</b>	101.9± 28.3
Fevern(%)	2 (66.7)	0.70; 0.62 (0.05- 7.39)	3 (100)	0.58; 2.45 (0.11- 50.67)	0 (0)	0.06; 0.05 (0.002- 1.23)	6 (100)	0.18; 7.14 (0.38- 133.60)	41 (75.9)
Headachen( %)	3 (100)	<b>0.02; 31.32 (1.49- 658.3)</b>	2 (66.7)	0.09; 8.2 (0.67- 99.70)	0 (0)	0.78; 0.64 (0.02- 14.41)	0 (0)	0.42; 0.29 (0.01- 5.66)	12 (22.2)
Myalgian(%)	1 (33.3)	0.44; 2.69 (0.22- 33.28)	1 (33.3)	0.44; 2.69 (0.22- 33.28)	0 (0)	0.96; 0.92 (0.04- 20.66)	1 (16.7)	0.98; 1.02 (0.10- 9.98)	9 (16.7)
Arthralgia n(%)	1 (33.3)	0.12; 8.00 (0.55- 115.4)	0 (0)	0.24; 11.22 (0.19- 635.7)	0 (0)	0.63; 2.15 (0.08- 52.16)	0 (0)	0.85; 0.76 (0.03- 15.83)	4 (7.4)
Nausea and vomitingn(%)	1 (33.3)	0.64; 0.56 (0.04- 6.60)	2 (66.7)	0.47; 2.43 (0.21- 28.58)	0 (0)	0.32; 0.21 (0.009- 4.71)	1 (16.7)	0.16; 0.21 (0.02- 1.91)	25 (46.3)
Diarrhean(%)	1 (33.3)	0.76; 1.46	1 (33.3)	0.76; 1.46	0 (0)	0.68; 0.53	2 (33.3)	0.62; 1.58	14 (25.9)



Tachycardian (%)	1 (33.3)	(0.12-17.48) 0.18; 5.87 (0.43-79.78)	1 (33.3)	(0.12-17.48) 0.18; 5.87 (0.43-79.78)	0 (0)	(0.02-11.73) 0.73; 1.72 (0.07-40.80)	0 (0)	(0.25-9.74) 0.74; 0.60 (0.03-12.34)	5 (9.3)
Rash									
Time (days; Mean±SD)	1.3±0.6	0.36; NA	3.3±2.5	0.35; NA	2.5±2.1	0.94; NA	2.1±1.7	0.63; NA	2.6±2.5
Local - head n(%)	3 (100)		2 (66.7)		0 (0)		3 (50)		20 (37.0)
upper body n(%)	0 (0)	<b>0.03;</b>	1 (33.3)	0.30;	0 (0)	0.16;	3 (50)	0.49;	18 (33.3)
upper limbs n(%)	0 (0)	<b>24.65</b> <b>(1.18-</b>	0 (0)	3.66 <b>(0.31-</b>	0 (0)	7.66 <b>(0.42-</b>	0 (0)	1.82 <b>(0.33-</b>	3 (5.6)
lower limbs n(%)	0 (0)	<b>512.6)</b>	0 (0)	43.27)	1 (50)	139.26)	0 (0)	10.05)	7 (12.9)
diffuse n(%)	0 (0)		0 (0)		1 (50)		0 (0)		6 (11.2)
Scattering n(%)	3 (100)	0.84; 1.37 (0.06-28.97)	3 (100)	0.84; 1.37 (0.06-28.97)	1 (50)	0.20; 0.15 (0.08-2.78)	6 (100)	0.30; 4.65 (0.24-87.89)	46 (85.2)
Anemia									
Yes n(%)	3 (100)	<b>0.007;</b> <b>73.0</b>	2 (66.7)	<b>0.03;</b> <b>17.5</b>	0 (0)	0.97; 1.06 (0.04-24.77)	3 (50)	<b>0.01;</b> <b>11.0 (1.5-</b>	6 (11.1)
No n(%)	0 (0)	<b>(3.09-</b> <b>1720.1)</b>	1 (33.3)	<b>(1.28-</b> <b>238.91)</b>	2 (100)		3 (50)	<b>80.5)</b>	36 (66.7)
MMR Vaccine									
Yes n(%)	3 (100)	0.91; 1.18 (0.05-25.23)	3 (100)	0.91; 1.18 (0.05-25.23)	2 (100)	0.90; 0.82 (0.03-18.91)	5 (83.3)	0.77; 0.71 (0.07-7.20)	47 (87.0)
No n(%)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (16.7)	7 (13.0)	7 (13.0)
Blood count (Mean±SD)									
Hemoglobin level (g/dL)	9.5±0.6	<b>0.0014;</b> <b>NA</b>	11.1±2.6	0.53; NA	12.8±3.7	0.21; NA	11.2±1.0	0.56; NA	11.4±1.2
Hematocrit (%)	31.1±1.3	<b>0.04; NA</b>	33.8±4.7	0.78; NA	20.5±2.2	<b>0.0001;</b> <b>NA</b>	33.7±4.1	0.37; NA	34.9±3.4
Platelets (miles/mm <sup>3</sup> )	251±174	0.38; NA	301±194	<b>0.01; NA</b>	384±208	0.64; NA	298±69	0.59; NA	331±163
Leucocyte (miles/mm <sup>3</sup> )	5500±3700	0.19; NA	6553±4110	<b>0.005;</b> <b>NA</b>	13400±5232	0.13; NA	6233±1699	0.12; NA	8786±4433
Neutrophils (miles/mm <sup>3</sup> )	28±8	<b>0.04; NA</b>	32±10	<b>0.0002;</b> <b>NA</b>	44±1.4	0.68; NA	41±12	0.25; NA	49±16
Lymphocyte (miles/mm <sup>3</sup> )	62±10	<b>0.03; NA</b>	62±10	0.38; NA	44±8.5	0.79; NA	51±11	0.15; NA	40±19

C-reactive protein (mg/L)	67.4±2 4.9	<b>0.002;</b> <b>NA</b>	61.4±2 6.7	0.15; NA	25.5±0 .7	0.95; NA	1.2±0. 4	<b>0.01; NA</b>	26.5±2 7.1
---------------------------	---------------	----------------------------	---------------	----------	--------------	----------	-------------	-----------------	---------------

250 n: number; B19V: Parvovirus B19; EBV: Epstein-Barr Virus; HCMV:  
251 Cytomegalovirus; HHV-6: Human Herpesvirus 6; HHV-7: Human Herpesvirus  
252 7; OR: *odds-ratio*; 95% CI: 95% Confidence interval; m: months; y: years; NA:  
253 non-applicable; SD: standard deviation  
254 <sup>a</sup> P-value referred to the Pearson  $X^2$  test.  
255

256 Regarding adult individuals with acute febrile illnesses, 60 adults were  
257 included in the study. The median age was 38 years, the IQR was 21 years, and  
258 56.7% were female (Table 2).

259

260 **Table 2:** Demographical, clinical and laboratorial findings among adults with  
261 acute febrile illness (AFI)

Parameter	Parvovirus B19		Cytomegalovirus		Herpesvirus 6		Total (n = 60)
	B19V+ (n = 4)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	HCMV+ (n = 1)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	HHV-6+ (n = 2)	P-value <sup>a</sup> ; OR (95% CI)	
Gender							
Male n(%)	2 (50)	0.78; 1.33	0 (0)	0.60; 0.42	0 (0)	0.37; 0.24	26 (43.3)
Female n(%)	2 (50)	(0.1-19.1)	1 (100)	(0.01-10)	2 (100)	(0.01-5.3)	34 (56.7)
Age group (years)							
≤ 38n(%)	2 (50)	0.94;	1 (100)	2.91;	2 (100)	0.31;	31 (51.7)
>38n(%)	2 (50)	0.93 (0.1- 7.1)	0 (0)	0.51 (0.1- 74.1)	0 (0)	5.00 (0.2- 108)	29 (48.3)
Median age; range	40y; 22y- 54y	0.97; NA	34y	NA	33y; 29y-68y	0.53; NA	38y; 18y- 68y
Race / ethnicity							
White n(%)	1 (25)	0.11; 0.14	1 (100)	0.73; 1.76	2 (100)	0.47; 3.11	20 (33.3)
Black n(%)	3 (75)	(0.01-1.5)	0 (0)	(0.06-47)	0 (0)	(0.13-71)	11 (18.3)
Unknown n(%)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		29 (48.4)
Fever n(%)	3 (75)	0.91; 0.88	0 (0)	0.14; 0.08	2 (100)	0.80; 1.48	47 (78.3)
Headachen( %)	2 (50)	(0.08-9.2) 0.72; 0.69	1 (100)	(0.03-2.2) 0.63; 2.21	0 (0)	(0.06-32) 0.19; 0.13	35 (58.3)
Retroorbital pain n(%)	0 (0)	(0.09-5.3) 0.59; 0.44	1 (100)	(0.08-56) 0.11; 14.1 (0.5- 371)	1 (50)	(0.06-2.8) 0.28; 4.8 (0.27-83)	11 (18.3)

Myalgia n(%)	1 (25)	0.49; 0.44 (0.04-4.5)	0 (0)	0.63; 0.45 (0.01-11)	0 (0)	0.39; 0.26 (0.01-5.7)	25 (41.7)
Arthralgia n(%)	2 (50)	0.62; 0.60 (0.07-4.5)	0 (0)	0.33; 0.20 (0.07-5.1)	1 (50)	0.73; 0.61 (0.03-10)	37 (61.7)
Nausea and vomiting n(%)	1 (25)	0.93; 1.10 (0.10-11)	0 (0)	0.97; 1.04 (0.04-27)	0 (0)	0.75; 0.61 (0.02-13)	14 (23.3)
Rash n (%)	2 (50)	0.94; 0.93 (0.12-7.1)	1 (100)	0.51; 2.90 (0.11-74)	1 (50)	0.96; 0.93 (0.05-15)	31 (51.7)
Time (days; Mean±SD)	4.5±2.1	0.95; NA	1	NA	3	NA	4.2±3.7
Local n (%)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		4 (6.7)
head	0 (0)	0.25; 6.11	0 (0)	0.46; 3.41	0 (0)	0.46; 3.41	3 (5)
upper body	0 (0)	(0.26-	0 (0)	(0.12-90)	0 (0)	(0.12-90)	3 (5)
upper limbs	0 (0)	138)	0 (0)		0 (0)		6 (10)
lower limbs	0 (0)		0 (0)		0 (0)		15 (25)
diffuse	2 (50)		1 (100)		1 (50)		
Anemia							
Yes n(%)	3 (75)	<b>0.04;</b>	0 (0)	0.95; 0.90	0 (0)	0.68; 0.53	14 (23.3)
No n(%)	1 (25)	<b>10.6 (1.1-112)</b>	1 (100)	(0.03-23)	2 (100)	(0.02-11)	40 (66.7)
Unknownn(%)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		6 (10)
Blood count (Mean±SD)							
Hemoglobin level (g/dL)	12.9±1.4	0.57; NA	13.3	NA	12.8±0.6	0.56; NA	13.4±1.5
Hematocrit (%)	36.9±3.6	0.30; NA	39.2	NA	37.5±0.8	0.60; NA	38.9±4.1
Platelets (miles/mm <sup>3</sup> )	313±59.8	0.06; NA	294	NA	262±56.6	0.72; NA	241±81.9
Leucocyte (miles/mm <sup>3</sup> )	5975±862	0.38; NA	8560	NA	8530±678	0.63; NA	7401±3394
Neutrophils (miles/mm <sup>3</sup> )	57.5±21.5	0.74; NA	65	NA	50.5±12	0.37; NA	59.9±14.9
Lymphocyte (miles/mm <sup>3</sup> )	29±16.7	0.91; NA	24	NA	37±11.3	0.47; NA	29.8±14.3
C-reactive protein (mg/L)	0.8±0.7	0.32; NA	0.89	NA	4.7±6.3	0.43; NA	2.7±3.7

262 n: number; B19V: Parvovirus B19; EBV: Epstein-Barr Virus; HCMV:

263 Cytomegalovirus; HHV-6: Human Herpesvirus 6; HHV-7: Human Herpesvirus

264 7; OR: odds-ratio; 95% CI: 95% Confidence interval; m: months; y: years; NA:

265 non-applicable; SD: standard deviation

266 <sup>a</sup> P-value referred to the Pearson  $X^2$  test.

267

268 **Molecular and Serological B19V markers**

269 B19V DNA was detected in three RD patients (5.5%; 3/54), with a mean  
 270 ( $\pm$  standard deviation) viral load of  $4.0 \times 10^4$  ( $\pm 2.9 \times 10^4$ ) IU/mL (Table 3). B19V  
 271 DNA was also detected in four AFI patients (6.6%; 4/60), with a mean ( $\pm$  standard  
 272 deviation) viral load of  $3.0 \times 10^5$  ( $\pm 1.3 \times 10^4$ ) IU/mL (Table 3).

273

274 **Table 3:** Molecular Parvovirus B19 and Herpesviruses markers among rash  
 275 diseases (RD) and acute febrile illness (AFI) patients attending in three different  
 276 Hospitals in Rio de Janeiro during 2018-2019

Etiological agent	RD (n=54)		AFI (n=60)		Total (n=114)
	n (%)	Viral load (IU/mL; Mean $\pm$ SD)	n (%)	Viral load (IU/mL; Mean $\pm$ SD)	n (%)
B19V	3 (5.5)	$4.0 \times 10^4$ $\pm 2.9 \times 10^4$	4 (6.6)	$3.0 \times 10^5$ $\pm 1.3 \times 10^4$	7 (6.1)
EBV	2 (3.4)	$7.1 \times 10^4$ $\pm 4.2 \times 10^1$	0 (0)	-	2 (1.8)
HCMV	3 (5.5)	$3.9 \times 10^4$ $\pm 2.2 \times 10^4$	1 (1.6)	$2.4 \times 10^3$ <sup>a</sup>	4 (3.5)
HHV-6	6 (11.1)	$6.4 \times 10^5$ $\pm 3.9 \times 10^5$	2 (3.3)	$3.1 \times 10^4$ $\pm 4.2 \times 10^4$	8 (7.0)
HHV-7	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)
Total	14 (25.9)	-	7 (11.7)	-	21 (18.4)

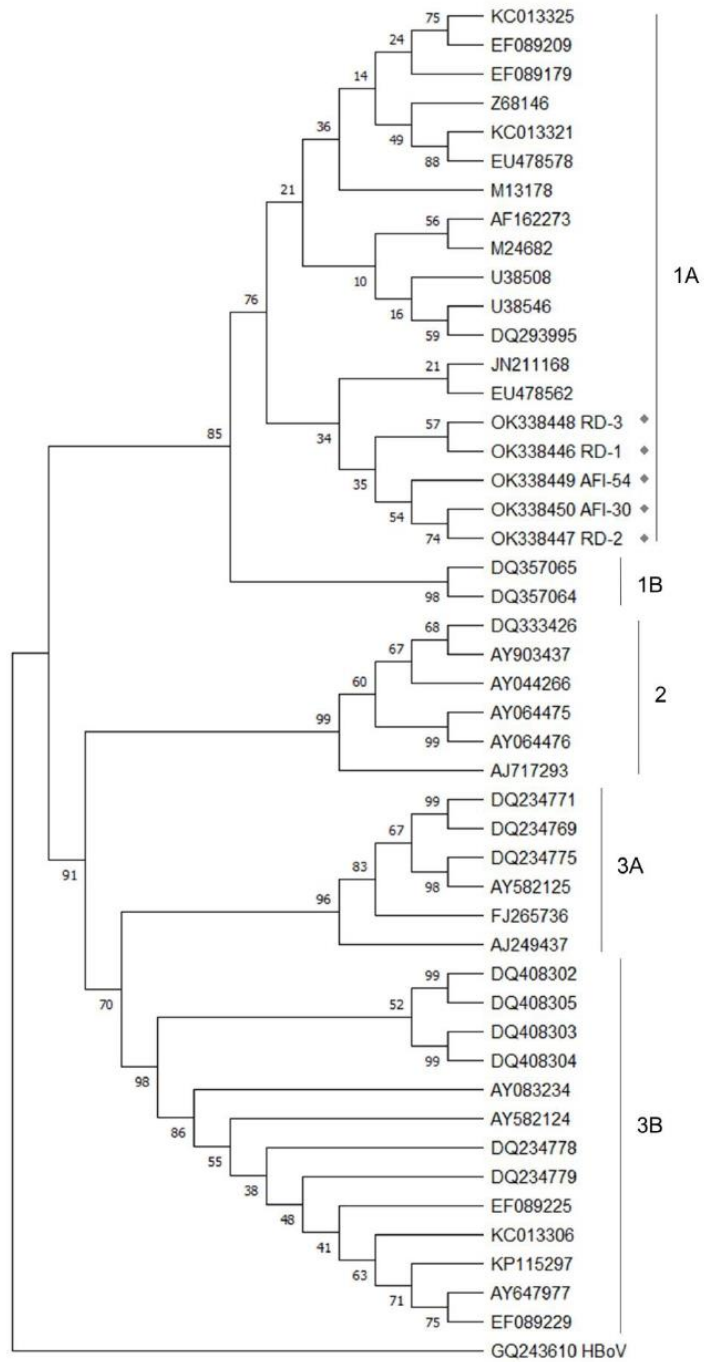
277 B19V: Parvovirus B19; EBV: Epstein-Barr Virus; HCMV: Cytomegalovirus; HHV-  
 278 6: Human Herpesvirus 6; HHV-7: Human Herpesvirus 7; IU/mL: International  
 279 units per milliliter; RD: Rash diseases; AFI: Acute febrile illness; n: number; SD:  
 280 standard deviation

281 <sup>a</sup> As this infection was positive only in one patient, there is no mean  $\pm$  SD, but  
 282 only the viral load of this patient.

283

284 B19V isolated from RD (n=3) and AFI (n=2) patients were classified as  
 285 genotype 1A (Figure 1). The nucleotide sequences obtained during this study

286 were deposited in the GenBank database under accession numbers OK338446  
 287 to OK338450.  
 288



289



290 **Figure 1:** Evolutionary history of B19V genotypes, detected in patients with RD  
 291 and AFI from Rio de Janeiro, Brazil between 2018 and 2019, inferred by using  
 292 the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei+G+I model. All analysis were  
 293 conducted in Mega X. The samples of this study were marked by gray diamonds  
 294 and named by RD and AFI prefix-numbers.  
 295

296 An overall, 6.1% (7/114) of the patients had B19V infection (Table 3). Anti-  
 297 B19V IgM and IgG was investigated among these B19V DNA positive RD and  
 298 AFI patients (n=7) to evaluate acute or persistent infection. Anti-B19V IgG was  
 299 found in 100% (7/7) and anti-B19V IgM was detected in 71.4% (5/7) of them.  
 300 Among anti-B19V IgM positive, 66.7% (2/3) were RD patients and 75.0% (3/4)  
 301 were AFI patients.

302 During the following-up, all consecutive samples (from RD collected 1  
 303 month, 3 months and 6 months, and from AFI collected 1 week, 1 month and 2  
 304 months) were B19V DNA negative (Table 4).  
 305

306 **Table 4:** Follow-up of molecular and serological markers of Parvovirus B19  
 307 among rash diseases (RD) and acute febrile illness (AFI) patients attending in  
 308 three different Hospitals in Rio de Janeiro during 2018-2019

Patient	Age (years)	Gender	Hb (g/dL) <sup>a</sup>	Onset of symptoms	Rash Diseases											
					0			2 months			3 months			6 months		
					DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG
#1	7	M	<b>9,6</b>	1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
#2	6	F	<b>9,5</b>	2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
#3	1	M	<b>9,5</b>	1	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+

Patient <sup>b</sup>	Age (years)	Gender	Hb (g/dL) <sup>a</sup>	Onset of symptoms	Acute Febrile Illness											
					0			1 week			1 month			2 months		
					DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG	DNA	IgM	IgG
#25	22	F	15,1	6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
#29	50	M	<b>12,6</b>	4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
#30	54	M	<b>12,1</b>	4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+

309  
 310 B19V: Parvovirus B19; Hb: Hemoglobin; IU/mL: International units per milliliter;  
 311 IgM: Immunoglobulin M; IgG: Immunoglobulin G; -: negative; +: positive; RD:  
 312 Rash diseases; AFI: Acute febrile illness.

313 <sup>a</sup> In bold are patients considered to have anemia

314 <sup>b</sup> One female AFI patient (#54) positive for B19V was not included in this table,  
315 because she did not return for subsequent sample collections of this study  
316

### 317 **Molecular EBV, HCMV, HHV-6, HHV-7 markers**

318 EBV DNA was detected in two RD patients (3.4%; 2/54), with a mean ( $\pm$   
319 standard deviation) viral load of  $7.1 \times 10^4 \pm 4.2 \times 10^1$  copies/mL and was not  
320 detected in AFI patients (Table 3). HCMV DNA was detected in three RD patients  
321 (5.5%; 3/54), with a mean ( $\pm$  standard deviation) viral load of  $3.9 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$   
322 copies/mL and in one AFI patient (1.6%; 1/60), with a viral load of  $2.4 \times 10^3$   
323 copies/mL (Table 3). HHV-6 DNA was detected in six RD patients (11.1%; 6/54),  
324 with a mean ( $\pm$  standard deviation) viral load of  $6.4 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^5$  copies/mL and  
325 in two AFI patients (3.3%; 2/60), with a mean ( $\pm$  standard deviation) viral load of  
326  $3.1 \times 10^4 \pm 4.2 \times 10^4$  copies/mL (Table 3). HHV-7 DNA was not detected neither in  
327 RD nor AFI patients (Table 3).

328 A total of 11 RD patients (20.4%) and three AFI patients (5.0%) was  
329 infected by some herpesvirus, totalizing 14/114 (12.3%) of the patients in this  
330 study with a herpesvirus infection (Table 3).

331

### 332 **Clinical manifestations and biochemical analysis among** 333 **RD patients**

334 According to the table 1, six of the 54 RD patients presented anemia  
335 (11.1%), with the mean hemoglobin level of  $11.4 \pm 1.2$  g/dL. All B19V DNA  
336 positive patients (3/3) had anemia (OR=73.0,  $p=0.007$ , CI=3.09-1720.1),  
337 headache (OR=31.32,  $p=0.02$ , CI=1.49-658.3), and head as a local of rash  
338 (OR=24.65,  $p=0.03$ , CI=1.18-512.6). In the blood count of these patients the

339 hemoglobin level ( $p=0.0014$ ), hematocrit ( $p=0.04$ ) and neutrophils ( $p=0.04$ ) were  
340 significantly lower compared to the RD-B19V-negative-patients, while the  
341 lymphocyte ( $p=0.03$ ), C-reactive protein ( $p=0.002$ ) were significantly higher  
342 compared to the RD-B19V-negative-patients (Table 1).

343 Two of three HCMV DNA positive patients (66.7%) presented anemia  
344 ( $OR=17.5$ ,  $p=0.03$ ,  $CI= 1.28-238.91$ ). In the blood count of HCMV DNA positive  
345 patients, the platelets ( $p=0.01$ ), leucocytes ( $p=0.005$ ) and neutrophils ( $p=0.0002$ )  
346 were significantly lower compared to the RD-HCMV-negative-patients (Table 1).

347 In the blood count of EBV DNA positive patients the hematocrit ( $p=0.0001$ )  
348 was significantly lower compared to the RD-EBV-negative-patients (Table 1).

349 Among the HHV-6 positive patients, three (50%) of them presented  
350 anemia ( $OR=11.0$ ,  $CI=1.5-80.5$ ,  $p=0.01$ ). The height ( $p=0.02$ ) and the C-reactive  
351 protein ( $p=0.01$ ) of these patients was significantly lower compared to the RD-  
352 HHV-6-negative-patients (Table 1).

353 It was not observed a significant relation between the presence of B19V  
354 or Herpesvirus DNA and age, gender, race (or ethnicity), number of people living  
355 at home, fever, myalgia, arthralgia, nausea and vomiting, diarrhea, tachycardia,  
356 and MMR vaccine ( $p>0.05$ ; Table 1).

357

## 358 **Clinical manifestations and biochemical analysis among** 359 **AFI patients**

360 According to the table 2, among the individuals with AFI infected with  
361 B19V, only the presence of anemia was considered statistically significant  
362 ( $OR=10.6$ ,  $CI=1.1-112$ ,  $p=0.04$ ). It was not observed a significant relation  
363 between the presence of B19V or Herpesvirus DNA and age, gender, race (or

364 ethnicity), fever, headache, retroorbital pain, myalgia, arthralgia, nausea and  
365 vomiting, rash, and values on blood count ( $p>0.05$ ; Table 2).

366

## 367 **Discussion**

368

369 In this study, through the differential diagnosis of Parvovirus (B19V) and  
370 Herpesvirus (CMV, EBV, HHV-6 and 7), we identified the etiology of RD and AFI  
371 diseases whose diagnosis had not been possible with only the clinical diagnosis.

372 Of the patients enrolled at the study, 14 received a clinical diagnosis  
373 compatible with rash diseases (causes by infectious agents: scarlet fever,  
374 Herpesvirus 6, Zika, Chikungunya, Coxsackie, Dengue, Measles, Chickenpox;  
375 and other causes as: Kawasaki, pharmacodermia and pancytopenia). Of these  
376 patients, only one case of Herpesvirus 6 infection was confirmed by laboratory  
377 diagnosis. However, two patients were diagnosed by epidemiological link and  
378 clinical presentation with infection by Chikungunya and Measles viruses,  
379 respectively, but molecular diagnosis revealed the presence of Epstein-Barr and  
380 HHV-6 viruses. These findings evidence the importance of differential laboratory  
381 diagnosis of patients with RD. It is also worth notice that the clinicians who  
382 attended these cases did not observe a clinical compatible with Cytomegalovirus  
383 and Parvovirus B19.

384 The assessment of B19V incidence among individuals with RD and/or AFI  
385 varies widely in the literature according to geographical location and time.  
386 Furthermore, these studies differed largely in terms of study design and  
387 laboratory approach. At this study it was observed an overall prevalence of 6.1%  
388 (7/114) of B19V infection. A study from Spain reported laboratory confirmed B19V

389 infection in 33.42% of the 368 RD cases studied, showing that B19V was the  
390 main etiological agent of RD [25]. Epidemiological data on B19V infection among  
391 adults are scarce, but it has been demonstrated that 40% of adults with AFI have  
392 undefined etiology [10]. Other studies detected 7.2% (33/456) of B19V in Kerala-  
393 India [26]; 35% (322/906) between 2005 to 2008 in Belarus [27] and 4.4% of  
394 B19V using metagenomic NGS in Tororo - Uganda [28].

395 In Brazil, a recent published review [18] showed that the incidence of  
396 B19V in RD cases varied from 1.5% (6/401) in 1997 at Pará state (north region)  
397 [29] to 63.2% (115/182) between 2013 to 2014 at São Paulo state (southeast  
398 region) [13]. In Rio de Janeiro state (southeast region) the B19V incidence varied  
399 from 2.3% in 1992-1994 to 31.5% in 1994-1999 [30-33].

400 An important characteristic in the Parvovirus B19 infection in Brazil is its  
401 cyclical pattern of occurrence between 4 to 5 years, contemplating years with  
402 high infection rates followed by periods with low incidences, as happened in  
403 1988-1989, 1995-1996, 1999-2000, 2004-2005, 2009-2010, 2013-2014 [18, 34,  
404 35]. After this period there was not observational study that demonstrated  
405 epidemic years of B19V infection.

406 As all B19V positive patients became DNA negative during the follow-up  
407 study, is possible to indicate that all patients presented acute self-limited  
408 infection. In one patient (AFI #25) is possible to observe that in this patient there  
409 is no presence of IgM anti-B19V in any moment of the follow-up, we can  
410 hypothesize that the infection in this patient was in the past, as happens in other  
411 cases of B19V infection [36, 37] or the detection of IgM in this case because of  
412 the immunocomplex that could exist in acute B19V infection and result in negative  
413 IgM anti-B19V [38].



414 This study simultaneously evaluated all betaherpesviruses and the  
415 Epstein-Barr virus in RD and AFI population. Until now, there is no other study  
416 that evaluated all these herpesviruses in same population. Qualitative detection  
417 of Herpesviruses in serum is considered sufficient to diagnose active infection  
418 [39]. However, a high viral load has been linked to greater severity of infection in  
419 cases of herpesviruses infection [40]. This is the first study that portrays  
420 herpesvirus viral loads in RD patients. In our study, the mean viral loads observed  
421 for EBV and HCMV were greater than  $7.0 \times 10^4$  and  $3.0 \times 10^4$  copies/mL,  
422 respectively, and for HHV-6, greater than  $6.0 \times 10^5$  copies/mL. As already  
423 described in a study that compared the presence of active infection with the viral  
424 load of HHV-6, viral load values with an average of  $10^5$  copies/mL are indicative  
425 of active infection for HHV-6 [41]. Viral loads observed in the present study were  
426 considered high compared to tissue samples which showed loads between  $10^2$ -  
427  $10^3$  copies/ $\mu$ g for HHV-6 and EBV [42, 43], and in newborn serum with  $10^3$ - $10^4$   
428 copies/ $\mu$ L of HCMV [44]. Human Herpesvirus 6 had the highest detection  
429 frequency among the three viruses evaluated, however, it was not possible to  
430 make a comparison with other studies in Brazil and in the world, as most of the  
431 studies that analyze RD and AFI only performed serological detection. In 2008,  
432 Vianna and collaborators found a seroprevalence of 43.5% for HHV-6 out of a  
433 total of 223 samples in the city of Niterói-RJ, with fever (93.8%) and disseminated  
434 exanthema (90.7%) in the most cases [45].

435 In our study, HHV-7 was not detected. However a study conducted in  
436 2011, using the Nested PCR technique, it was detected in 6.4% (9/141) of RD  
437 cases in children (<4 years) [4]. The differences found in the prevalence of HHV-  
438 6 and HHV-7 may be related to the larger sample number used in the 2008 and

439 2011 studies. Another relevant point was the inclusion criteria of the studied  
440 populations, as both studies excluded previously positive samples for measles,  
441 rubella, dengue and B19V in the serological diagnosis, different from our study  
442 that included all RD and AFI patients without previous etiological diagnosis.

443         With this seroprevalence data among B19V and Herpesviruses we could  
444 observe that there are not current results about these infections. This is not only  
445 an epidemiological problem, but a public health problem, because these  
446 infections could become clinical significant in some population.

447         In Brazil and in other Latin American countries, the current triple epidemic  
448 of arboviruses as Dengue, Zika and Chikungunya increased the challenge of  
449 clinicians to conduct diagnosis of AFI and RD on a syndrome-based approach.  
450 The concurrent circulation of these viruses highlights a need of conducting  
451 differential laboratory diagnosis of AFI and RD since there is no clinical algorithm  
452 robust enough to distinguish between the viruses that share remarkably similar  
453 clinical manifestations as Parvovirus B19 and Herpesviruses. Rash were  
454 observed in all patients below 18 years (children and adolescents) included in the  
455 study. The most prevalent signs and symptoms among infected patients were  
456 fever (81.8%), pruritus (36.4%), diarrhea (27.3%), headache, nausea, and  
457 myalgia (18.2%).

458         The rash in EBV-positive patients was presented as disseminated or on  
459 the lower limbs, progressing to spread throughout the body. Infectious EBV  
460 mononucleosis with rash and fever, although more common in adolescents and  
461 young adults, can also be seen in children [46]. HCMV positive patients had fever  
462 (100%), headache, pruritus, and nausea (66.6%); vomiting, myalgia, and

463 diarrhea (33.3%). The exanthemas appeared in the regions of the trunk and  
464 head, progressing in a disseminated way throughout the body.

465 The profile of symptoms associated with HHV-6 infection found in the  
466 current study contained fever (100%), pruritus and diarrhea (33.3%); myalgia and  
467 vomiting (16.6%) corroborating previous findings on literature [45]. Most of rash  
468 (66.7%) in HHV-6 infections started in the head or neck and progressed to the  
469 whole body in a diffuse manner, confirming the description found by Korman and  
470 collaborators [47].

471 All RD-B19V positive patients (3/3) had anemia, headache, and the head  
472 as a local of the rash. In relation to the AFI-B19V positive patients, all but one  
473 (3/4) had anemia. These clinical manifestations are commonly found in  
474 Parvovirus B19 infection [48]. Although all the patients with anemia progressed  
475 to a good outcome, this clinical finding deserves attention as it is an important  
476 aggravation of the infection and can lead to worse outcomes, mainly in  
477 immunocompromised patients [49, 50].

478 Even with the presence of these clinical signs and symptoms, no finding is  
479 pathognomonic of RD and AFI, which reinforces the importance of laboratory  
480 diagnosis.

481 The detection of B19V, EBV, HCMV, HHV-6 and 7 was possible using  
482 qPCR, demonstrating the importance of molecular diagnosis in identifying the  
483 etiologic agent in cases of RD and AFI with undefined etiology. The prevalence  
484 of these viruses highlights the importance of differential diagnosis of these  
485 infections in face of those diseases, not only for epidemiological purposes, but  
486 also for the proper management of the patient.

487

## 488 **Acknowledgement**

489

490 Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ), National Council for Scientific and  
491 Technological Development (CNPq), and Coordination for the Improvement of  
492 Higher Education Personnel (CAPES) funded this study. The authors would like  
493 to thanks the teams from the Hospital Getúlio Vargas Filho and Hospital  
494 Universitário Antônio Pedro. The authors have no other relevant affiliations or  
495 financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or  
496 financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript  
497 apart from those disclosed.

498

## 499 **References**

500

- 501 1. F D, G C, G G, L C, S J, A T, et al. Contemporary infectious exanthems: an update.  
502 Future microbiology. 2017;12. doi: 10.2217/fmb-2016-0147. PubMed PMID: 27838923.
- 503 2. Suga S, Yoshikawa T, Kajita Y, Ozaki T, Asano Y. Prospective Study of Persistence  
504 and Excretion of Human Herpesvirus-6 in Patients With Exanthem Subitum and Their  
505 Parents. Pediatrics. 1998;102(4):900-4. doi: 10.1542/peds.102.4.900.
- 506 3. Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory  
507 assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV),  
508 varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human  
509 immunodeficiency virus (HIV). Reprod Toxicol. 2006;21(4):350-82. doi:  
510 10.1016/j.reprotox.2006.02.001. PubMed PMID: 16564672.
- 511 4. Magalhães leM, Martins RV, Vianna RO, Moysés N, Afonso LA, Oliveira SA, et al.  
512 Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with  
513 exanthema subitum. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(3):371-3. PubMed PMID:  
514 21655829.
- 515 5. Bastola A, Sah R, Rajbhandari SK, Jha R, Fathah Z, Chalise BS, et al. SARS-CoV-2  
516 and Orientia tsutsugamushi co-infection in a young teen, Nepal: Significant burden in  
517 limited-resource countries in Asia? narra j. 2021;1(2). doi:  
518 <https://narraj.org/main/article/view/34>.
- 519 6. PN R, AM vE, S C, SZ A, A D, P B, et al. Dengue, chikungunya, and scrub typhus  
520 are important etiologies of non-malarial febrile illness in Rourkela, Odisha, India. BMC



- 521 infectious diseases. 2019;19(1). doi: 10.1186/s12879-019-4161-6. PubMed PMID:  
522 31269906.
- 523 7. Buonora SNP, Sonia Regina Lambert. Daumas, Regina Paiva. Machado, Matheus  
524 Garcia Lago. Berardinelli, Guilherme Miguéis. de Oliveira, Diana Neves Rodrigues. de  
525 Oliveira, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes. Pitfalls in acute febrile illness diagnosis:  
526 Interobserver agreement of signs and symptoms during a dengue outbreak - Buonora -  
527 2020 - Journal of Clinical Nursing - Wiley Online Library. Journal of Clinical Nursing.  
528 2020;29:1590-8. doi: 10.1111/jocn.15229.
- 529 8. SR M, KH J, NB dB, KL R, M N, JG O, et al. Etiology of acute undifferentiated febrile  
530 illness in the Amazon basin of Ecuador. The American journal of tropical medicine and  
531 hygiene. 2009;81(1). PubMed PMID: 19556580.
- 532 9. F C, E A, V dA, E B, CP Y. Rapid diagnostic tests for non-malarial febrile illness in  
533 the tropics. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European  
534 Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(5). doi: 10.1111/1469-  
535 0691.12154. PubMed PMID: 23413992.
- 536 10. Moreira J, Bressan CS, Brasil P, Siqueira AM. Epidemiology of acute febrile illness  
537 in Latin America. Clin Microbiol Infect. 2018;24(8):827-35. Epub 2018/05/20. doi:  
538 10.1016/j.cmi.2018.05.001. PubMed PMID: 29777926.
- 539 11. Vigilância Sd. Boletim Epidemiológico. In: Saúde Md, editor.: CGARB/DEIDT;  
540 2021. p. 28.
- 541 12. Saude Md. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo  
542 Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. In: Saude SdVe,  
543 editor. Brasilia2020. p. 1-16.
- 544 13. Di Paola N, Mesquita FS, Oliveira DBL, Villabona-Arenas CJ, Zaki Pour S, de Sousa-  
545 Capra C, et al. An Outbreak of Human Parvovirus B19 Hidden by Dengue Fever. Clin  
546 Infect Dis. 2019;68(5):810-7. Epub 2018/10/12. doi: 10.1093/cid/ciy630. PubMed PMID:  
547 30304533.
- 548 14. Brown KE. The expanding range of parvoviruses which infect humans. Rev Med  
549 Virol. 2010;20(4):231-44. doi: 10.1002/rmv.648. PubMed PMID: 20586082.
- 550 15. EE M, KJ P. Metabolic considerations in reconstitution of the small intestine after  
551 jejunoileal bypass. Surgery, gynecology & obstetrics. 1976;142(2). PubMed PMID:  
552 813311.
- 553 16. O K, Y AK. Herpes Virus Type 6. StatPearls [Internet]. 2020;2021:10. doi:  
554 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31082042/>. PubMed PMID: 31082042.
- 555 17. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. Clin Microbiol Rev.  
556 2017;30(1):43-113. doi: 10.1128/CMR.00040-16. PubMed PMID: 27806994; PubMed  
557 Central PMCID: PMC5217800.
- 558 18. Garcia C, Leon A. Human parvovirus B19: a review of clinical and epidemiological  
559 aspects in Brazil. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0123>. 2020. doi: 10.2217/fmb-2020-  
560 0123.
- 561 19. Alonso A, Distefano A, Carlino O, Polito A. [Exanthematous outbreak caused by  
562 human parvovirus B19 in a school in Banderl6, Argentina]. Rev Argent Microbiol.  
563 2003;35(3):171-4. PubMed PMID: 14587381.
- 564 20. Alves ADRCG, Rita de Cassia Nasser. Cruz, Oswaldo Gonçalves. Pinto, Marcelo  
565 Alves. Amado Leon, Luciane Almeida. Quantitative real-time PCR for differential  
566 diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. Expert Review of  
567 Molecular Diagnostics. 2019. doi: <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1582333>.



- 568 21. Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T. Characterization of  
569 erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis  
570 and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci.* 2007;4(2):105-9.  
571 PubMed PMID: 17479159; PubMed Central PMCID: PMCPMC1852398.
- 572 22. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary  
573 Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9. Epub  
574 2018/05/04. doi: 10.1093/molbev/msy096. PubMed PMID: 29722887; PubMed Central  
575 PMCID: PMCPMC5967553.
- 576 23. Fellner MD, Durand K, Rodriguez M, Irazu L, Alonio V, Picconi MA. Duplex  
577 realtime PCR method for Epstein-Barr virus and human DNA quantification: its  
578 application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection.  
579 *2014;18(3):271-80.* doi: 10.1016/j.bjid.2013.07.011.
- 580 24. Raposo JV, Alves ADR, Silva AdSd, Santos DCd, Melgaço JG, Moreira OC, et al.  
581 Multiplex qPCR facilitates identification of betaherpesviruses in patients with acute liver  
582 failure of unknown etiology. *BMC Infectious Diseases.* 2019;19(1):1-8. doi:  
583 doi:10.1186/s12879-019-4309-4.
- 584 25. Vega Alonso T, Gil Costa M, Rodríguez Recio M, la Serna Higuera Pd, Centinelas  
585 de Castilla y León RdM, España. DGdSPCdSyBSV, et al. Incidencia y características clínicas  
586 de los exantemas maculopapulares de etiología viral. *Atención Primaria.*  
587 2003;32(9):517-23.
- 588 26. Seetha D, Pillai HR, Nori SRC, Kalpathodi SG, Thulasi VP, Nair RR. Molecular-  
589 genetic characterization of human parvovirus B19 prevalent in Kerala State, India.  
590 *Virology Journal.* 2021;18(1):1-8. doi: doi:10.1186/s12985-021-01569-1.
- 591 27. MA Y, JM H, GV S, EO S, CP M. Human parvovirus B19 surveillance in patients  
592 with rash and fever from Belarus. *Journal of medical virology.* 2012;84(6). doi:  
593 10.1002/jmv.23294. PubMed PMID: 22499021.
- 594 28. Ramesh A, Nakielnny S, Hsu J, Kyohere M, Byaruhanga O, de Bourcy C, et al.  
595 Metagenomic next-generation sequencing of samples from pediatric febrile illness in  
596 Tororo, Uganda. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218318. Epub 2019/06/21. doi:  
597 10.1371/journal.pone.0218318. PubMed PMID: 31220115; PubMed Central PMCID:  
598 PMCPMC6586300.
- 599 29. Freitas RB, Monteiro TA, Linhares AC. Outbreaks of human-herpes virus 6 (HHV-  
600 6) infection in day-care centers in Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*  
601 2000;42(6):305-11. PubMed PMID: 11136516.
- 602 30. Cubel RC, Siqueira MM, Santos EO, Pires MF, Cruz CM, Nascimento JP. Human  
603 parvovirus B19 infections among exanthematic diseases notified as measles. *Rev Soc*  
604 *Bras Med Trop.* 1997;30(1):15-20. Epub 1996/01/01. PubMed PMID: 8993105.
- 605 31. Oliveira SA, Camacho LA, Pereira AC, Faillace TF, Setubal S, Nascimento JP.  
606 Clinical and epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection in an urban area  
607 in Brazil (Niterói city area, State of Rio de Janeiro, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*  
608 2002;97(7):965-70. PubMed PMID: 12471422.
- 609 32. Wermelinger MC, Oelemann WM, Lima de Mendonça MC, Naveca FG, von  
610 Hubinger MG. Detection of human parvovirus B19 infection: a study of 212 suspected  
611 cases in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol.* 2002;25(2):223-30. PubMed PMID:  
612 12367658.
- 613 33. Mendonça MC, Ribeiro SB, Couceiro JN, von Hubinger MG. Parvovirus B19  
614 infections in state of Rio de Janeiro, Brazil: 526 sera analyzed by IgM-enzyme-linked

- 615 immunosorbent assay and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz.  
616 2005;100(8):847-52. doi: /S0074-02762005000800005. PubMed PMID: 16444415.
- 617 34. de Freitas RB, Wong D, Boswell F, de Miranda MF, Linhares AC, Shirley J, et al.  
618 Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote  
619 rural areas in northern Brazil. J Med Virol. 1990;32(4):203-8. PubMed PMID: 1964474.
- 620 35. Oliveira MI, Afonso AMS, Curti SP, Silva PE, Barbosa TF, Silva ER, et al. Genotype  
621 1 of human parvovirus B19 in clinical cases. Rev Assoc Med Bras (1992). 2017;63(3):224-  
622 8. doi: 10.1590/1806-9282.63.03.224. PubMed PMID: 28489127.
- 623 36. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19  
624 infection. J Intern Med. 2006;260(4):285-304. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01697.x.  
625 PubMed PMID: 16961667.
- 626 37. Sasaki T, Murai C, Muryoi T, Takahashi Y, Munakata Y, Sugamura K, et al.  
627 Persistent infection of human parvovirus B19 in a normal subject. Lancet. 346.  
628 England1995. p. 851.
- 629 38. Bredl S, Plentz A, Wenzel JJ, Pfister H, Möst J, Modrow S. False-negative serology  
630 in patients with acute parvovirus B19 infection. J Clin Virol. 2011;51(2):115-20. doi:  
631 10.1016/j.jcv.2011.03.012. PubMed PMID: 21530386.
- 632 39. H A, P B, A G-D. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6  
633 infections. Clinical microbiology reviews. 2015;28(2). doi: 10.1128/CMR.00122-14.  
634 PubMed PMID: 25762531.
- 635 40. Y A, T N, T Y, S S, T Y. Severity of human herpesvirus-6 viremia and clinical findings  
636 in infants with exanthem subitum. The Journal of pediatrics. 1991;118(6). doi:  
637 10.1016/s0022-3476(05)82200-0. PubMed PMID: 1645770.
- 638 41. Raposo JV, Sarmiento DJdS, Pinto RBdS, Lopes AO, Gallottini M, Tozetto-Mendoza  
639 TR, et al. Longitudinal study on oral shedding of human betaherpesviruses 6 and 7 in  
640 renal transplant recipients reveals active replication. Journal of Oral Microbiology.  
641 2020;12:8. doi: 10.1080/20002297.2020.1785801.
- 642 42. P S, DR C, Y A, L B, RW C, AL K, et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma  
643 of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain  
644 reaction. The Journal of infectious diseases. 1995;171(2). doi: 10.1093/infdis/171.2.273.  
645 PubMed PMID: 7844362.
- 646 43. Monteiro TAF, Costa IB, Costa IB, Corrêa TLdS, Coelho BMR, Silva AES, et al.  
647 Genotypes of Epstein–Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious  
648 mononucleosis in the metropolitan area of Belém, Brazil, between 2005 and 2016.  
649 Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2021;24:322-9. doi: 10.1016/j.bjid.2020.06.004.
- 650 44. N K, T Z, W K, H R, N S, J S, et al. Patient cytomegalovirus seropositivity with or  
651 without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-  
652 related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant  
653 in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. British journal of haematology.  
654 2001;113(4). doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02849.x. PubMed PMID: 11442503.
- 655 45. Vianna RA, de Oliveira SA, Camacho LA, Knowles W, Brown D, Pereira AC, et al.  
656 Role of human herpesvirus 6 infection in young Brazilian children with rash illnesses.  
657 Pediatr Infect Dis J. 2008;27(6):533-7. doi: 10.1097/INF.0b013e3181673c50. PubMed  
658 PMID: 18449066.
- 659 46. Muzumdar S, Rothe MJ, Grant-Kels JM. The rash with maculopapules and fever  
660 in adults. Clin Dermatol. 2019;37(2):109-18. Epub 2019/04/15. doi:  
661 10.1016/j.clindermatol.2018.12.004. PubMed PMID: 30981291.

- 662 47. Korman AM, Alikhan A, Kaffenberger BH. Viral exanthems: An update on  
663 laboratory testing of the adult patient. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(3):538-50. Epub  
664 2016/10/26. doi: 10.1016/j.jaad.2016.08.034. PubMed PMID: 28413059.
- 665 48. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev.*  
666 2002;15(3):485-505. Epub 2002/07/05. PubMed PMID: 12097253; PubMed Central  
667 PMCID: PMCPMC118081.
- 668 49. Rajput R, Sehgal A, Jain D, Sen R, Gupta A. Acute parvovirus b19 infection leading  
669 to severe aplastic anemia in a previously healthy adult female. *Indian J Hematol Blood*  
670 *Transfus.* 2012;28(2):123-6. doi: 10.1007/s12288-011-0112-0. PubMed PMID:  
671 23730023; PubMed Central PMCID: PMCPMC3332267.
- 672 50. Qian XH, Zhang GC, Jiao XY, Zheng YJ, Cao YH, Xu DL, et al. Aplastic anaemia  
673 associated with parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child.* 2002;87(5):436-7. PubMed  
674 PMID: 12390927; PubMed Central PMCID: PMCPMC1763065.
- 675

## 4 DISCUSSÃO

A infecção pelo Parvovirus humano B19 (B19V) pode afetar diversos grupos populacionais, com diferenças em seu desfecho clínico, de acordo com o perfil imunológico e hematológico dessas populações. No presente estudo foram avaliados pacientes com falência hepática aguda, doença renal crônica e doenças exantemáticas e/ou doenças febris agudas.

O diagnóstico molecular da infecção pelo B19V não é comumente realizado como diagnóstico diferencial, principalmente entre os grupos avaliados no presente estudo. No presente estudo, uma PCR em tempo real foi padronizada e validada para detecção e quantificação do DNA de B19V, a fim de estabelecer um diagnóstico diferencial para B19V em diversos grupos de pacientes. Para tanto, foram avaliados: o limite de detecção (sensibilidade), especificidade, reprodutibilidade e repetibilidade (intra-teste), seguindo as diretrizes da ANVISA para validação de métodos bioanalíticos<sup>313</sup>. O limite de detecção (LD) de B19 DNA foi de  $6,26 \times 10^1$  cópias/mL (ou  $2,45 \times 10^2$  UI/mL) usando a metodologia Sybrgreen e de 4,48 cópias/mL (ou 14,96 UI/mL) usando a metodologia Taqman (fator de conversão de 3,34, de acordo com Koppelman e colaboradores<sup>314</sup>). Esse resultado corrobora os achados de estudos anteriores que mostraram LD variando de 20,04 UI/mL a  $3,34 \times 10^2$  UI/mL<sup>315,316</sup>. O limite de quantificação (LQ) foi de  $10^4$  e  $10^2$  cópias/mL para Sybrgreen e Taqman, respectivamente. Este foi assumido, considerando-se a quantificação precisa de todas as réplicas analisadas (4/4). O LD é mais frequentemente abaixo da faixa linear de um ensaio e não pode ser maior que o LQ<sup>317</sup>.

Utilizando o gene de controle interno de amplificação (RNase P), não houve resultados falso-negativos da detecção e/ou quantificação de B19V nas amostras testadas durante a validação do ensaio, o que demonstra a precisão dos resultados<sup>318</sup>. Não foi observada reação cruzada pela metodologia Taqman, ao testar outros vírus, confirmando a especificidade deste ensaio para a infecção por B19V. Este ensaio também demonstrou melhor precisão, uma vez que os parâmetros ficaram melhores nessa metodologia, que no Sybrgreen. Portanto, posteriormente, foram avaliadas as características de desempenho do ensaio Taqman para o diagnóstico de infecção por B19V entre os casos de ALF criptogênicos. Foi possível detectar o B19V DNA em 30% (3/10) dos casos de ALF criptogênicos, utilizando essa metodologia<sup>319</sup>.

Esses resultados demonstram a importância do uso de um método molecular sensível e específico para esclarecer a infecção por B19V nos casos de ALF

criptogênicos; utilizando amostras de soro e tecido hepático. O ensaio apresentou ótimo desempenho no diagnóstico diferencial e investigação de causas de ALF e outras populações de estudo.

Além da otimização de um ensaio de PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19V DNA, o presente estudo também visou estabelecer um protocolo de tratamento das amostras de soro com a enzima Benzonase® para determinar se uma infecção é aguda ou persistente, pela presença de partículas virais completas ou do “DNA *naked*”.

A presença de B19V DNA pode ser detectada por um longo período após sua infecção aguda<sup>262</sup>. Porém, a presença de B19V DNA no sangue não se correlaciona necessariamente com a presença de partículas virais infecciosas (vírions)<sup>262</sup>. Neste estudo foi acompanhada, durante 59 dias, a infecção experimental de macacos *Cynomolgus (Macaca fascicularis)* após inoculação intravenosa do B19V. Foi observada uma alta e persistente viremia de B19V na maioria dos animais, mesmo após a soroconversão. Nossos resultados demonstraram que nos primeiros 31 dias após a infecção aguda pelo B19V, a presença do B19V DNA é indicativa de vírions infecciosos. Posteriormente, o B19V DNA pôde ser degradado pela Benzonase, indicando que o “DNA *naked*” estaria predominante.

A transição de vírions infecciosos para “DNA *naked*” pode estar relacionado ao desaparecimento de B19V IgM, com o subsequente aparecimento de anticorpos IgG neutralizantes<sup>320</sup>. No presente estudo essa transição pôde ser observada durante o acompanhamento dos macacos *Cynomolgus*, porém como foram acompanhados poucos animais e em um curto período de infecção essa transição não foi clara em todos os casos.

O “DNA *naked*” do B19V foi detectado, em geral, quando os níveis de B19V DNA se encontravam abaixo de  $10^4$  UI/mL (Ct  $\geq 33$ ), indicando que amostras de indivíduos infectados com esta carga viral não são potencialmente infecciosas. Esse resultado é de grande relevância em bancos de sangue, tendo em vista que a detecção de B19V DNA em amostras de doadores de sangue com carga viral  $< 10^4$  cópias/mL não representa um risco residual de transmissão por transfusão sanguínea, já que esses doadores de sangue com baixa viremia não apresentam mais partículas infecciosas do B19V<sup>321</sup>.

A infecção persistente do B19V consiste na presença de uma carga viral menor a  $10^4$  cópias/mL combinada à detecção de anti-B19V IgG, na ausência de anti-B19V IgM no sangue e em tecidos específicos meses ou anos após a infecção aguda<sup>93,262</sup>.



Desta forma, os resultados desse presente estudo indicam que em infecções persistentes por B19V, não estão presentes partículas virais infecciosas, sugerindo que a infecção persistente não está relacionada à replicação viral ativa.

Portanto, a presença do B19V DNA, cerca de 45 dias após a infecção aguda, provavelmente tem uma origem diferente e até o momento desconhecida. Uma hipótese para detecção do B19V DNA durante a infecção aguda, pode ser devido à própria replicação do vírus. O B19V infecta os progenitores dos eritrócitos através do receptor globosídeo P e então é endocitado. No entanto, essa endocitose em alguns tipos celulares que não são permissivas a infecção, não parece iniciar um ciclo de infecção produtiva, levando a um acúmulo de B19V DNA<sup>66</sup>. Uma vez em uma célula não permissiva, o B19V DNA pode permanecer resistente, já que as células não têm mecanismo para degradar o DNA. Isto é confirmado devido a detecção de B19V DNA em muitos tecidos não permissivos ao vírus<sup>93</sup>.

Quando essas células são danificadas por qualquer processo de doença (apoptose ou necrose) ou quando renovadas (renovação celular normal), o “DNA *naked*” pode ser liberado na circulação. Para células de vida longa, isso pode ocorrer anos ou mesmo décadas após a infecção inicial pelo B19V. Como diferentes tipos de células têm taxas de renovação diferentes, isso pode causar uma liberação estocástica do B19V DNA, explicando a viremia em declínio gradual após a infecção aguda. Além de apoptose e necrose, a liberação de DNA viral via exocitose pode contribuir para a presença do “DNA *naked*” no plasma<sup>262</sup>.

Estabelecer a natureza do B19V DNA é uma questão de importância tanto teórica, como prática. Para garantir a segurança na transfusão sanguínea e no transplante de órgãos, além de auxiliar na interpretação de manifestações clínicas atípicas. Pequenas quantidades de B19V DNA podem ser detectadas por ensaios de PCR, tanto o convencional como o em tempo real, isso porque são técnicas muito sensíveis. No entanto, eles não diferenciam entre a partícula infecciosa do vírus e o “DNA *naked*”. Portanto, o método de tratamento com uma endonuclease que cliva qualquer DNA ou RNA presente em uma amostra é bastante útil para determinar se o B19V DNA é infeccioso e ligado à replicação ou não<sup>262</sup>.

Este estudo demonstrou que cerca de 45 dias após a infecção aguda, os níveis de B19V DNA abaixo de  $10^5$  UI/mL não são consequência da replicação ativa de B19V. O pré-tratamento de amostras de sangue com Benzonase<sup>®</sup> possibilitou a discriminação entre “DNA *naked*” (não relacionado à replicação) e B19V DNA encapsidado em vírions. Este método de tratamento pode ser útil para resolver

controvérsias sobre o papel do B19V como agente etiológico de diferentes manifestações clínicas.

Os achados deste presente estudo demonstram ter uma futura aplicação para o diagnóstico de diversas infecções virais, uma vez que com o desenvolvimento de técnicas moleculares avançadas e de alta sensibilidade para detecção de genomas virais, tem sido observado cada vez mais um período prolongado de viremia das infecções virais, assim como uma disseminação de genomas virais em múltiplos órgãos de pacientes infectados. Estabelecer a relevância da viremia nesses casos, assim como, a relação causal deste achado com a infecção é de suma importância para o correto diagnóstico laboratorial em diferentes infecções virais.

Como parte dos objetivos deste estudo, foram analisados alguns grupos populacionais para infecção pelo B19V. Entre os 30 pacientes com falência hepática aguda, sete (23%) tiveram B19V DNA detectado nas amostras de soro e fígado. A frequência de detecção de DNA de B19V nesses pacientes está de acordo com os achados de Eis-Hubinger e colaboradores<sup>322</sup> que mostraram alta incidência de infecção por B19V em fígados de pacientes com disfunção hepática (43%) e em amostras de fígado em pacientes autopsiados (24%). Outrossim, Wong e colaboradores<sup>58</sup> demonstraram que o DNA do B19V pode ser detectado em biópsias hepáticas de 30% (10/30) dos pacientes com infecção por HBV e/ou HCV.

A maioria dos pacientes com FHA com DNA B19V era positiva para IgG anti-B19V (6/7) e todos eram negativos para anticorpos IgM anti-B19V, indicando uma infecção persistente por B19V, o que é consistente com estudos anteriores que investigaram fígados (explantes) de pacientes adultos com FHA <sup>308,322-324</sup>.

Os transcritos de B19V (RNAm) foram detectados em todos os pacientes com disfunção hepática neste estudo. Esses dados indicam uma expressão gênica ativa de proteínas estruturais e não estruturais<sup>309,325</sup>, o que é indicativo de replicação intra-hepática de B19V com uma infecção ativa e produtiva. De acordo com Karetnyi e colaboradores<sup>324</sup>, a detecção do RNAm de B19V da proteína de capsídeo (VP1 e VP2) fornece evidências da infecção por B19V durante o curso da FHA criptogênica e sugere um papel do B19V na lesão hepática.

De acordo com estudos anteriores, a co-infecção com B19V e outros vírus hepatotrópicos, como o HBV, aumenta a gravidade da doença <sup>168,178,326</sup>. Juntos, esses resultados sugerem que o B19V pode causar lesão hepática de forma independente e produz um efeito sinérgico na co-infecção com o HBV que leva a um pior prognóstico. Além disso, a detecção concomitante de transcritos de VP1 e NS1

demonstrou uma produção de vírions completos em hepatócitos. Evidências adicionais de infecção ativa por B19V em quase todos os pacientes com FHA foram anemia e trombocitopenia, que são sinais típicos de comprometimento da medula óssea associado à infecção por B19V <sup>327</sup>. No entanto, apesar dos pacientes com FHA induzido por medicamento (FHA-2) e auto-imune (FHA-4), também não apresentaram anemia e icterícia, ambos apresentaram trombocitopenia como sinal de evolução da medula óssea.

Entre os pacientes com FHA sem etiologia conhecida (n=11) (criptogênica), três (FHA-1,5,7) foram classificados como infecção B19V persistente e produtiva, com anti-B19V IgG, DNA B19V e RNAm positivos. Todos apresentaram icterícia, anemia e anisocitose.

As análises filogenéticas feitas entre todas as populações estudadas demonstraram diferentes genótipos de B19V circulando. Entre os pacientes com DRC, duas amostras da unidade 3 foram agrupadas no genótipo 1A. O genótipo 1 é o mais comum no Brasil e representa uma frequência de 87,9% com base em poucos estudos <sup>60,62,328</sup>. Já entre os pacientes com FHA, o genótipo 1 foi detectado em três pacientes, enquanto o genótipo 3b foi detectado em quatro pacientes. Inesperadamente, o genótipo 3 foi o mais prevalente para essa população. Estudos brasileiros demonstraram a detecção do genótipo 3b em pacientes anêmicos infectados pelo HIV <sup>61,328</sup>, bem como em um paciente com lúpus eritematoso sistêmico e em crianças com doença exantemática de Belém, estado do Pará <sup>60</sup>. Ferry e colaboradores <sup>329</sup> encontraram o genótipo 3 em poucas amostras de uma grande coorte de pacientes anêmicos infectados pelo HIV na Suíça.

Entre os pacientes com DRC, foi observada uma alta frequência na detecção do DNA de B19V (145/221; 65%), sendo a maior prevalência detectada na unidade de diálise do Ceará (83,6%). Entretanto, outros estudos, com DRC no mesmo período e local, não foram encontrados. No Irã, a frequência do DNA de B19V entre DRC foi 10% (5/50) <sup>330</sup> e de 13,1% (13/99) em pacientes com DRC infectados com HIV <sup>331</sup>. Em outro estudo, com amostras brasileiras de pacientes com DRC coletadas em 2012 em Minas Gerais, o DNA de B19V foi encontrado em 8,1% (10/120) dos pacientes <sup>332</sup>. Entre o grupo controle de doadores de sangue, coletados em 2015 no Rio de Janeiro, foi detectada uma alta frequência de DNA de B19V (4,5%; 2/42). Um estudo conduzido em doadores de sangue de São Paulo, demonstrou uma frequência de 1% (1/100) <sup>333</sup>. No presente estudo, observou-se uma chance 38 vezes maior de infecção pelo B19V entre os pacientes com DRC do que entre os doadores de sangue (OR=38, p<0,0001;

95%IC 8,9-162,2). Isso indica que uma população submetida ao tratamento dialítico é mais suscetível a infecção pelo B19V do que uma população hígida.

A carga viral média detectada neste estudo foi de  $10^4$  UI/mL em DRC e doadores. De acordo com diversos autores, a carga viral  $>10^4$  UI/mL pode estar relacionada ao risco de transmissão de B19V nos componentes sanguíneos<sup>262,316</sup>.

Entre os pacientes com DRC com DNA B19V positivo, 78,6% (114/145) apresentaram IgG anti-B19V, sendo 100% (1/1) na unidade de diálise 1; 83,7% (31/37) na unidade 2 e 76,6% (82/07) na unidade 3. No Irã, a frequência de IgG anti-B19V entre pacientes com DRC foi de 54% (27/50)<sup>330</sup> e de 25% (24/99) em pacientes com DRC infectados com HIV<sup>331</sup>. Em outro estudo, com amostras brasileiras de pacientes com DRC coletadas em 2012 em Minas Gerais, o DNA de B19V foi encontrado em 67,5% (81/120) pacientes<sup>332</sup>.

A baixa carga viral relacionada à alta prevalência de IgG anti-B19V, corrobora com a ocorrência de infecção persistente por B19V na maioria dos pacientes com DRC. Embora a caracterização da infecção persistente seja dada pela baixa carga viral ( $<10^4$ UI/mL) associada à presença de anticorpos IgG anti-B19V, estudos correlacionando a detecção de DNA, RNA e proteínas virais com uma doença específica são limitados e muitas vezes contraditórios<sup>56,93,311</sup>.

Apesar da anemia nessa população de estudo não ser estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), ela foi encontrada em 60% dos pacientes com DRC, o que é comum devido à deficiência de eritropoietina e ferro e ao próprio procedimento de diálise<sup>204,205</sup>. A anemia está associada a mais hospitalizações, aumento da mortalidade e pior qualidade de vida, mas a morbimortalidade depende principalmente da etiologia da anemia e do estágio da doença renal<sup>204,334</sup>. Estudos futuros são necessários para esclarecer a importância da infecção por B19V como causa de anemia nesta população. Quando se correlacionou anemia com uma possível co-infecção B19V e HBV/HCV, esta foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Já foi mencionado que a infecção pelo B19V é agravada na presença de vírus hepatotrópicos, essa pode ser uma possível explicação para esse quadro<sup>178</sup>.

A avaliação da incidência de B19V em indivíduos com doenças exantemática (DE) e doenças febris agudas (DFA) varia muito na literatura de acordo com a localização geográfica e o tempo. Além disso, esses estudos diferiram amplamente em termos de desenho de estudo e abordagem laboratorial. No presente estudo observou-se uma prevalência global de 6,1% (7/114) de infecção por B19V. Um estudo da Espanha relatou infecção laboratorialmente confirmada por B19V em

33,42% dos 368 casos de DE estudados, mostrando que o B19V foi o principal agente etiológico <sup>302</sup>. Os dados epidemiológicos sobre a infecção pelo B19V em adultos são escassos, mas já foi demonstrado que 40% dos adultos com AFI têm etiologia indefinida <sup>303</sup>. Outros estudos detectaram 7,2% (33/456) de B19V em Kerala-Índia <sup>335</sup>; 35% (322/906) entre 2005 a 2008 em Belarus <sup>336</sup> e 4,4% de B19V usando NGS metagenômico em Tororo - Uganda <sup>337</sup>.

No Brasil, uma recente revisão publicada <sup>338</sup> mostrou que a incidência de B19V em casos de DE variou de 1,5% (6/401) em 1997 no estado do Pará (região norte) <sup>339</sup> a 63,2% (115/182) entre 2013 até 2014 no estado de São Paulo (região sudeste) <sup>340</sup>. No estado do Rio de Janeiro (região sudeste) a incidência de B19V variou de 2,3% em 1992-1994 a 31,5% em 1994-1999 <sup>341-344</sup>.

Uma característica importante da infecção pelo Parvovírus B19 no Brasil é seu padrão cíclico de ocorrência entre 4 a 5 anos, contemplando anos com altas taxas de infecção seguidos de períodos com baixas incidências, como ocorreu em 1988-1989, 1995-1996, 1999-2000, 2004-2005, 2009-2010, 2013-2014 <sup>275,338,345</sup>. Após esse período não houve estudo observacional que demonstrasse anos epidêmicos de infecção pelo B19V.

Como todos os pacientes positivos para B19V tornaram-se negativos durante o estudo de seguimento, é possível indicar que todos os pacientes apresentaram infecção aguda autolimitada.

Devido à tríplice epidemia que o país vive, com Dengue, Zika e Chikungunya co-circulando, e apresentando manifestações clínicas semelhantes à infecção pelo B19V, um resultado negativo para essas arboviroses, poderia ser um indicativo para a inclusão do diagnóstico diferencial de B19V, o que não é rotineiramente realizado nos centros de saúde brasileiros. Nossos dados destacam a importância da infecção pelo B19V ser considerada no diagnóstico diferencial em diferentes grupos populacionais, principalmente durante os períodos epidêmicos do eritema infeccioso e em pacientes com anemia refratária.



## 5 CONCLUSÕES

- Foi otimizada uma técnica de PCR em tempo real sensível e específica para detecção e quantificação do B19V DNA. Essa técnica apresentou bons parâmetros de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e repetitividade;
- Também foi possível avaliar o teste laboratorial que consiste no pré-tratamento das amostras clínicas com a enzima endonuclease Benzonase, para diferenciar o B19V DNA encontrado, como sendo proveniente de vírions ou se seria um DNA “naked” remanescente, implicando no tipo de infecção associado a essa carga viral, se aguda ou persistente.
- O B19V contribuiu para o dano hepático entre os pacientes com falência hepática aguda, com um pior desfecho para pacientes co-infectados com HBV. Entretanto, estudos longitudinais são necessários para demonstrar a relação causal da infecção pelo B19V e a FHA. Os dados demonstram a importância do diagnóstico diferencial de B19V em casos de FHA principalmente durante períodos epidêmicos de eritema infeccioso e em pacientes com anemia refratária;
- Os pacientes com doença renal crônica apresentaram alta prevalência de B19V (65,6%) (nas unidades: 3,1%, 60,6% e 83,6%). Em relação ao grupo saudável (doadores de sangue) 4,7% tinham o B19V DNA. Foi observada diferença estatística significativa entre a detecção de B19V em DRC e em doadores de sangue, sugerindo que DRC sob diálise tem 38 vezes maior chance de infecção, o que poderia indicar a avaliação viral em um período epidêmico e o risco da transmissão do vírus em pessoas suscetíveis à infecção;
- Entre os pacientes com doença exantemática a prevalência da infecção pelo B19V foi de 6,12%, e em pacientes com doença febril aguda esse número foi de 6,55%. Esses são números abaixo do encontrado na literatura, mas que refletem a importância do diagnóstico diferencial do B19V nessas populações;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B. & Widdows, D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* **1**, 72-73 (1975).
- 2 Servant-Delmas, A., Lefrère, J. J., Morinet, F. & Pillet, S. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J Virol* **84**, 9658-9665 (2010). <https://doi.org:10.1128/JVI.00684-10>
- 3 Courouce, A. M. *et al.* [Parvovirus (serum-parvovirus-like-virus) and Aurillac antigen. A study of 18 cases]. *Rev Fr Transfus Immunohematol* **27**, 5-19 (1984).
- 4 Okochi, K., Mori, R., Miyazaki, M., Cohen, B. J. & Mortimer, P. P. Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *Lancet* **1**, 160-161 (1984).
- 5 Shneerson, J. M., Mortimer, P. P. & Vandervelde, E. M. Febrile illness due to a parvovirus. *Br Med J* **280**, 1580 (1980).
- 6 Pattison, J. R. *et al.* Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* **1**, 664-665 (1981).
- 7 Anderson, M. J., Lewis, E., Kidd, I. M., Hall, S. M. & Cohen, B. J. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)* **93**, 85-93 (1984).
- 8 Brown, T., Anand, A., Ritchie, L. D., Clewley, J. P. & Reid, T. M. in *Lancet* Vol. 2 1033-1034 (1984).
- 9 White, D. G. *et al.* Human parvovirus arthropathy. *Lancet* **1**, 419-421 (1985). [https://doi.org:10.1016/s0140-6736\(85\)91145-6](https://doi.org:10.1016/s0140-6736(85)91145-6)
- 10 da Silva Cruz, A., Serpa, M. J., Barth, O. M. & do Nascimento, J. P. Detection of the human parvovirus B19 in a blood donor plasma in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **84**, 279-280 (1989).
- 11 Nascimento, J. P., Buckley, M. M., Brown, K. E. & Cohen, B. J. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **32**, 41-45 (1990).
- 12 Freitas, R., Linhares, A., Miranda, M. & Gabbay, Y. Vol. 20 (ed Ministério da Saúde) 1-4 (Boletim Epidemiológico, Fundação SESP, 1988).
- 13 Takimoto, S. *et al.* Diagnóstico presuntivo rápido de infecção por parvovírus em pacientes com eritema infeccioso. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **52**, 27-30 (1992). <https://doi.org:https://doi.org/10.53393/rial.1992.v52.35961>
- 14 Cubel, R. C., Valadão, M. C., Pereira, W. V., Magalhães, M. C. & Nascimento, J. P. Aplastic crisis due to human parvovirus B19 infection in hereditary hemolytic anaemia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **34**, 479-482 (1992).
- 15 Cubel, R. C. *et al.* Human parvovirus B19 infection and hydrops fetalis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**, 147-151 (1996).
- 16 SF, C. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *The Journal of general virology* **100** (2019). <https://doi.org:10.1099/jgv.0.001212>
- 17 Cotmore, S. F. *et al.* The family Parvoviridae. *Arch Virol* **159**, 1239-1247 (2014). <https://doi.org:10.1007/s00705-013-1914-1>
- 18 Söderlund-Venermo, M. Emerging Human Parvoviruses: The Rocky Road to Fame. *Annu Rev Virol* **6**, 71-91 (2019). <https://doi.org:10.1146/annurev-virology-092818-015803>
- 19 Fisher, R. E. & Mayor, H. D. The evolution of defective and autonomous parvoviruses. *J Theor Biol* **149**, 429-439 (1991).
- 20 Allander, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12891-12896 (2005). <https://doi.org:10.1073/pnas.0504666102>

- 21 Jones, S. M. *et al.* New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. *Journal of Virology* **79**, 8230-8236 (2005). <https://doi.org:10.1128/JVI.79.13.8230-8236.2005>
- 22 Manning, A. *et al.* Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* **194**, 1283-1290 (2006). <https://doi.org:10.1086/508219>
- 23 Phan, T. G. *et al.* Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol* **86**, 11024-11030 (2012). <https://doi.org:10.1128/JVI.01427-12>
- 24 Phan, T. G. *et al.* A new densovirus in cerebrospinal fluid from a case of anti-NMDA-receptor encephalitis. *Arch Virol* **161**, 3231-3235 (2016). <https://doi.org:10.1007/s00705-016-3002-9>
- 25 Phan, T. G. *et al.* A new protoparvovirus in human fecal samples and cutaneous T cell lymphomas (mycosis fungoides). *Virology* **496**, 299-305 (2016). <https://doi.org:10.1016/j.virol.2016.06.013>
- 26 Cotmore, S. F. & Tattersall, P. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu Rev Virol* **1**, 517-537 (2014). <https://doi.org:10.1146/annurev-virology-031413-085444>
- 27 Heegaard, E. D. & Brown, K. E. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* **15**, 485-505 (2002).
- 28 Broliden, K., Tolfvenstam, T. & Norbeck, O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern Med* **260**, 285-304 (2006). <https://doi.org:10.1111/j.1365-2796.2006.01697.x>
- 29 Berns, K. I. in *Fundamental Virology* (eds D.M. Fields, P.M. Knipe, & B.N. Howley) 1017-1048 (Raven, 1996).
- 30 JP, C. Biochemical characterization of a human parvovirus. *The Journal of general virology* **65** ( Pt 1) (1984). <https://doi.org:10.1099/0022-1317-65-1-241>
- 31 Luo, Y. & Qiu, J. Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virol* **10**, 155-167 (2015). <https://doi.org:10.2217/fvl.14.103>
- 32 Ozawa, K. *et al.* Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol* **61**, 2395-2406 (1987).
- 33 Yoto, Y., Qiu, J. & Pintel, D. J. Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. *J Virol* **80**, 1604-1609 (2006). <https://doi.org:10.1128/JVI.80.3.1604-1609.2006>
- 34 Cotmore, S. F., McKie, V. C., Anderson, L. J., Astell, C. R. & Tattersall, P. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J Virol* **60**, 548-557 (1986).
- 35 Ozawa, K. & Young, N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol* **61**, 2627-2630 (1987).
- 36 Qiu, J., Söderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev* **30**, 43-113 (2017). <https://doi.org:10.1128/cmr.00040-16>
- 37 Servant-Delmas, A. & Morinet, F. Update of the human parvovirus B19 biology. *Transfus Clin Biol* **23**, 5-12 (2016). <https://doi.org:10.1016/j.tracli.2015.11.006>
- 38 Zhi, N. *et al.* Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol* **80**, 5941-5950 (2006). <https://doi.org:10.1128/JVI.02430-05>
- 39 Adamson-Small, L. A. & Ruiz-Ordaz, B. H. Hepatic inflammation resulting from localized, subcutaneous expression of Parvovirus VP1u capsid protein: Importance and implication. *Virulence* **7**, 70-71 (2016). <https://doi.org:10.1080/21505594.2016.1141163>

- 40 Zádori, Z. *et al.* A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**, 291-302 (2001).
- 41 Zuffi, E. *et al.* Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans. *Viral Immunol* **14**, 151-158 (2001). <https://doi.org:10.1089/088282401750234529>
- 42 Kajigaya, S., Shimada, T., Fujita, S. & Young, N. S. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7601-7605 (1989).
- 43 Kajigaya, S. *et al.* Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4646-4650 (1991).
- 44 Ballou, W. R., Reed, J. L., Noble, W., Young, N. S. & Koenig, S. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J Infect Dis* **187**, 675-678 (2003). <https://doi.org:10.1086/368382>
- 45 Hicks, K. E., Cubel, R. C., Cohen, B. J. & Clewley, J. P. Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. *Arch Virol* **141**, 1319-1327 (1996).
- 46 Erdman, D. D., Durigon, E. L., Wang, Q. Y. & Anderson, L. J. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J Gen Virol* **77** ( Pt 11), 2767-2774 (1996). <https://doi.org:10.1099/0022-1317-77-11-2767>
- 47 Nguyen, Q. T. *et al.* Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol* **37**, 2483-2487 (1999).
- 48 Nguyen, Q. T., Wong, S., Heegaard, E. D. & Brown, K. E. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology* **301**, 374-380 (2002).
- 49 Hokynar, K. *et al.* A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology* **302**, 224-228 (2002).
- 50 Servant, A. *et al.* Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol* **76**, 9124-9134 (2002).
- 51 Toan, N. L. *et al.* Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol* **87**, 2941-2949 (2006). <https://doi.org:10.1099/vir.0.82037-0>
- 52 Corcoran, C., Hardie, D., Yeats, J. & Smuts, H. Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1. *J Clin Microbiol* **48**, 137-142 (2010). <https://doi.org:10.1128/JCM.00610-09>
- 53 Nguyen, Q. T. *et al.* Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia. *Lancet* **352**, 1524 (1998). [https://doi.org:10.1016/S0140-6736\(05\)60330-3](https://doi.org:10.1016/S0140-6736(05)60330-3)
- 54 Parsyan, A., Szmargd, C., Allain, J. P. & Candotti, D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol* **88**, 428-431 (2007). <https://doi.org:10.1099/vir.0.82496-0>
- 55 Sanabani, S., Neto, W. K., Pereira, J. & Sabino, E. C. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J Clin Microbiol* **44**, 604-606 (2006). <https://doi.org:10.1128/JCM.44.2.604-606.2006>
- 56 Norja, P. *et al.* Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7450-7453 (2006). <https://doi.org:10.1073/pnas.0602259103>

- 57 Kühl, U. *et al.* Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J Med Virol* **80**, 1243-1251 (2008). <https://doi.org:10.1002/jmv.21187>
- 58 Wong, S., Young, N. S. & Brown, K. E. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J Infect Dis* **187**, 1581-1586 (2003). <https://doi.org:10.1086/374781>
- 59 Hübschen, J. M. *et al.* Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol* **47**, 3735-3738 (2009). <https://doi.org:10.1128/JCM.01201-09>
- 60 Freitas, R. B. *et al.* Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. *J Clin Virol* **43**, 60-65 (2008). <https://doi.org:10.1016/j.jcv.2008.03.033>
- 61 Keller, L. W. *et al.* Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of an erythrovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. *Arch Virol* **154**, 1685-1687 (2009). <https://doi.org:10.1007/s00705-009-0482-x>
- 62 Cubel Garcia, R. C. *et al.* Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. *Braz J Infect Dis* **21**, 102-106 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.bjid.2016.11.002>
- 63 Azevedo, K. M. *et al.* Parvovirus B19 seroconversion in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 356-361 (2012).
- 64 da Costa, A. C. *et al.* Investigation of human parvovirus B19 occurrence and genetic variability in different leukaemia entities. *Clin Microbiol Infect* **19**, E31-43 (2013). <https://doi.org:10.1111/1469-0691.12058>
- 65 Brown, K. E., Anderson, S. M. & Young, N. S. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-117 (1993).
- 66 Ganaie, S. S. & Qiu, J. Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 166 (2018). <https://doi.org:10.3389/fcimb.2018.00166>
- 67 Wong, S. *et al.* Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J Virol* **82**, 2470-2476 (2008). <https://doi.org:10.1128/JVI.02247-07>
- 68 Filippone, C. *et al.* VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* **374**, 444-452 (2008). <https://doi.org:10.1016/j.virol.2008.01.002>
- 69 Weigel-Van Aken, K. A. Pharmacological activation of guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rap1 recruits high-affinity beta1 integrins as coreceptors for parvovirus B19: improved ex vivo gene transfer to human erythroid progenitor cells. *Hum Gene Ther* **20**, 1665-1678 (2009). <https://doi.org:10.1089/hum.2009.123>
- 70 Young, N. S. Parvovirus infection and its treatment. *Clin Exp Immunol* **104 Suppl 1**, 26-30 (1996).
- 71 Young, N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol* **25**, 159-172 (1988).
- 72 Momoeda, M., Wong, S., Kawase, M., Young, N. S. & Kajigaya, S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J Virol* **68**, 8443-8446 (1994).
- 73 Guan, W., Wong, S., Zhi, N. & Qiu, J. The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus. *J Virol* **83**, 9541-9553 (2009). <https://doi.org:10.1128/JVI.00702-09>



- 74 Young, N. S., Mortimer, P. P., Moore, J. G. & Humphries, R. K. Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. *J Clin Invest* **73**, 224-230 (1984).  
<https://doi.org:10.1172/jci111195>
- 75 Mortimer, P. P., Humphries, R. K., Moore, J. G., Purcell, R. H. & Young, N. S. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* **302**, 426-429 (1983).
- 76 Takahashi, T. *et al.* DNA replication of parvovirus B 19 in a human erythroid leukemia cell line (JK-1) in vitro. *Arch Virol* **131**, 201-208 (1993).
- 77 Munshi, N. C., Zhou, S., Woody, M. J., Morgan, D. A. & Srivastava, A. Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J Virol* **67**, 562-566 (1993).
- 78 Shimomura, S. *et al.* First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood* **79**, 18-24 (1992).
- 79 Miyagawa, E. *et al.* Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods* **83**, 45-54 (1999).
- 80 Bostic, J. R., Brown, K. E., Young, N. S. & Koenig, S. Quantitative analysis of neutralizing immune responses to human parvovirus B19 using a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based assay. *J Infect Dis* **179**, 619-626 (1999).  
<https://doi.org:10.1086/314648>
- 81 Brown, C. S., Van Lent, J. W., Vlak, J. M. & Spaan, W. J. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol* **65**, 2702-2706 (1991).
- 82 Caul, E. O., Usher, M. J. & Burton, P. A. Intrauterine infection with human parvovirus B19: a light and electron microscopy study. *J Med Virol* **24**, 55-66 (1988).
- 83 Koduri, P. R. Novel cytomorphology of the giant proerythroblasts of parvovirus B19 infection. *Am J Hematol* **58**, 95-99 (1998).
- 84 Schmidt, I., Blümel, J., Seitz, H., Willkommen, H. & Löwer, J. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. *Vox Sang* **81**, 228-235 (2001).
- 85 Chisaka, H. *et al.* Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. *Tohoku J Exp Med* **209**, 277-283 (2006).
- 86 Woolf, A. D. *et al.* Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med* **149**, 1153-1156 (1989).
- 87 Setúbal, S., Córdias, C. A., de Oliveira, S. A. & do Nascimento, J. P. Viremic blood donor found by a rapid screening method in a season of high human parvovirus B19 activity in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**, 95-99 (2004).
- 88 Yoto, Y. *et al.* Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br J Haematol* **91**, 1017-1018 (1995).
- 89 Choi, S. H. *et al.* A case of persistent anemia in a renal transplant recipient: association with parvovirus B19 infection. *Scand J Infect Dis* **34**, 71-75 (2002).
- 90 Morey, A. L. *et al.* Parvovirus B19 infection and transient fetal hydrops. *Lancet* **337**, 496 (1991).
- 91 Plentz, A. & Modrow, S. Diagnosis, management and possibilities to prevent parvovirus B19 infection in pregnancy. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.11.120> (2011).  
<https://doi.org:10.2217/fvl.11.120>
- 92 Young, N. S. & Brown, K. E. Parvovirus B19. *N Engl J Med* **350**, 586-597 (2004).  
<https://doi.org:10.1056/NEJMra030840>
- 93 Adamson-Small, L. A., Ignatovich, I. V., Laemmerhirt, M. G. & Hobbs, J. A. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus Res* **190**, 8-16 (2014).  
<https://doi.org:10.1016/j.virusres.2014.06.017>

- 94 Cassinotti, P., Weitz, M. & Siegl, G. Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J Med Virol* **40**, 228-234 (1993).
- 95 Brown, K. E., Young, N. S., Alving, B. M. & Barbosa, L. H. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion* **41**, 130-135 (2001).
- 96 Musiani, M. *et al.* Persistent B19 parvovirus infections in haemophilic HIV-1 infected patients. *J Med Virol* **46**, 103-108 (1995).
- 97 Azzi, A., Zakrzewska, K., Bertoni, E., Guidi, S. & Salvadori, M. Persistent parvovirus B19 infections with different clinical outcomes in renal transplant recipients: diagnostic relevance of polymerase chain reaction (PCR) and of quantification of B19 DNA in sera. *Clin Microbiol Infect* **2**, 105-108 (1996).
- 98 Mendelson, E., Aboudy, Y., Smetana, Z., Tepperberg, M. & Grossman, Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod Toxicol* **21**, 350-382 (2006). <https://doi.org:10.1016/j.reprotox.2006.02.001>
- 99 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* **7**, e33316 (2012). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0033316>
- 100 Wang, J. H. *et al.* Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* **98**, 611-618 (2008). <https://doi.org:10.1038/sj.bjc.6604196>
- 101 Li, Y. *et al.* Detection of parvovirus B19 nucleic acids and expression of viral VP1/VP2 antigen in human colon carcinoma. *Am J Gastroenterol* **102**, 1489-1498 (2007). <https://doi.org:10.1111/j.1572-0241.2007.01240.x>
- 102 Lu, J., Zhi, N., Wong, S. & Brown, K. E. Activation of synoviocytes by the secreted phospholipase A2 motif in the VP1-unique region of parvovirus B19 minor capsid protein. *J Infect Dis* **193**, 582-590 (2006). <https://doi.org:10.1086/499599>
- 103 Polcz, M. E. *et al.* Increased IL-6 detection in adult and pediatric lymphoid tissue harboring parvovirus B19. *J Clin Virol* **57**, 233-238 (2013). <https://doi.org:10.1016/j.jcv.2013.02.022>
- 104 Poole, B. D., Karetnyi, Y. V. & Naides, S. J. Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol* **78**, 7775-7783 (2004). <https://doi.org:10.1128/JVI.78.14.7775-7783.2004>
- 105 Poole, B. D., Zhou, J., Grote, A., Schiffenbauer, A. & Naides, S. J. Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J Virol* **80**, 4114-4121 (2006). <https://doi.org:10.1128/JVI.80.8.4114-4121.2006>
- 106 Nuesch, J. P., Lacroix, J., Marchini, A. & Rommelaere, J. Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res* **18**, 3516-3523 (2012). <https://doi.org:10.1158/1078-0432.ccr-11-2325>
- 107 Beghetti, M., Gervais, A., Haenggeli, C. A., Berner, M. & Rimensberger, P. C. Myocarditis associated with parvovirus B19 infection in two siblings with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Eur J Pediatr* **159**, 135-136 (2000).
- 108 Finkel, T. H. *et al.* Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet* **343**, 1255-1258 (1994).
- 109 Nigro, G. *et al.* Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. *Lancet* **343**, 1260-1261 (1994).
- 110 Ferguson, P. J. *et al.* Prevalence of human parvovirus B19 infection in children with Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis Rheum* **39**, 880-881 (1996).
- 111 Gabriel, S. E. *et al.* The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of giant cell arteritis: a preliminary evaluation. *Arthritis Rheum* **42**, 1255-1258 (1999).

- [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199906\)42:6<1255::AID-ANR23>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199906)42:6<1255::AID-ANR23>3.0.CO;2-P)
- 112 Smith, S. B., Libow, L. F., Elston, D. M., Bernert, R. A. & Warschaw, K. E. Gloves and socks syndrome: early and late histopathologic features. *J Am Acad Dermatol* **47**, 749-754 (2002).
- 113 Kim, Y. W. *et al.* Allopurinol-induced aplastic anemia in a patient with chronic kidney disease. *Clin Nephrol* **71**, 203-206 (2009).
- 114 Kerr, J. R. *et al.* Evidence for the role of demyelination, HLA-DR alleles, and cytokines in the pathogenesis of parvovirus B19 meningoencephalitis and its sequelae. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **73**, 739-746 (2002).
- 115 Arista, S., De Grazia, S., Di Marco, V., Di Stefano, R. & Craxì, A. Parvovirus B19 and "cryptogenic" chronic hepatitis. *J Hepatol* **38**, 375-376 (2003).
- 116 Anderson, M. J. *et al.* Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* **152**, 257-265 (1985).
- 117 Suga, S., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ozaki, T. & Asano, Y. Prospective Study of Persistence and Excretion of Human Herpesvirus-6 in Patients With Exanthem Subitum and Their Parents. *Pediatrics* **102**, 900-904 (1998).  
<https://doi.org/10.1542/peds.102.4.900>
- 118 Magalhães, I. e. M. *et al.* Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with exanthema subitum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**, 371-373 (2011).
- 119 TK, Y. & VS, O. Exanthematous Eruptions in Children. *Pediatric annals* **49** (2020).  
<https://doi.org/10.3928/19382359-20200220-01>
- 120 Zerbini, M. *et al.* Different syndromes associated with B19 parvovirus viraemia in paediatric patients: report of four cases. *Eur J Pediatr* **151**, 815-817 (1992).
- 121 Nocton, J. J., Miller, L. C., Tucker, L. B. & Schaller, J. G. Human parvovirus B19-associated arthritis in children. *J Pediatr* **122**, 186-190 (1993).
- 122 Mohan, A., Joseph, S., Sidharthan, N. & Murali, D. Carbimazole-induced agranulocytosis. *J Pharmacol Pharmacother* **6**, 228-230 (2015).  
<https://doi.org/10.4103/0976-500X.171881>
- 123 Woolf, A. D. Human parvovirus B19 and arthritis. *Behring Inst Mitt*, 64-68 (1990).
- 124 Speyer, I., Breedveld, F. C. & Dijkmans, B. A. Human parvovirus B19 infection is not followed by inflammatory joint disease during long term follow-up. A retrospective study of 54 patients. *Clin Exp Rheumatol* **16**, 576-578 (1998).
- 125 Söderlund, M. *et al.* Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* **349**, 1063-1065 (1997).  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)09110-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)09110-6)
- 126 Dijkmans, B. A. *et al.* Human parvovirus B19 DNA in synovial fluid. *Arthritis Rheum* **31**, 279-281 (1988).
- 127 Muir, K., Todd, W. T., Watson, W. H. & Fitzsimons, E. Viral-associated haemophagocytosis with parvovirus-B19-related pancytopenia. *Lancet* **339**, 1139-1140 (1992).
- 128 Rao, S. P., Miller, S. T. & Cohen, B. J. Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease. B19 parvovirus studies during a 7-year period. *Am J Dis Child* **146**, 1328-1330 (1992).
- 129 Saarinen, U. M. *et al.* Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **67**, 1411-1417 (1986).
- 130 Anderson, M. J., Davis, L. R., Jones, S. E., Pattison, J. R. & Serjeant, G. R. The development and use of an antibody capture radioimmunoassay for specific IgM to a human parvovirus-like agent. *J Hyg (Lond)* **88**, 309-324 (1982).
- 131 Chorba, T. *et al.* The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis* **154**, 383-393 (1986).

- 132 Bell, L. M., Naides, S. J., Stoffman, P., Hodinka, R. L. & Plotkin, S. A. Human parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients. *N Engl J Med* **321**, 485-491 (1989).  
<https://doi.org:10.1056/NEJM198908243210801>
- 133 Kurtzman, G. J. *et al.* Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med* **317**, 287-294 (1987).  
<https://doi.org:10.1056/NEJM198707303170506>
- 134 Kurtzman, G. J., Cohen, B., Meyers, P., Amunullah, A. & Young, N. S. Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. *Lancet* **2**, 1159-1162 (1988).
- 135 Koch, W. C., Massey, G., Russell, C. E. & Adler, S. P. Manifestations and treatment of human parvovirus B19 infection in immunocompromised patients. *J Pediatr* **116**, 355-359 (1990).
- 136 Weiland, H. T., Salimans, M. M., Fibbe, W. E., Kluin, P. M. & Cohen, B. J. Prolonged parvovirus B19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant patient. *Br J Haematol* **71**, 300 (1989).
- 137 Frickhofen, N., Arnold, R., Hertenstein, B., Wiesneth, M. & Young, N. S. Parvovirus B19 infection and bone marrow transplantation. *Ann Hematol* **64 Suppl**, A121-124 (1992).
- 138 Hasle, H. *et al.* Parvovirus B19 infection infrequently involved in children and adults with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* **20**, 81-83 (1996).
- 139 Graeve, J. L., de Alarcon, P. A. & Naides, S. J. Parvovirus B19 infection in patients receiving cancer chemotherapy: the expanding spectrum of disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **11**, 441-444 (1989).
- 140 Frickhofen, N. *et al.* Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med* **113**, 926-933 (1990).
- 141 Nigro, G. *et al.* Parvovirus infection in children with AIDS: high prevalence of B19-specific immunoglobulin M and G antibodies. *AIDS* **6**, 679-684 (1992).
- 142 Taillan, B. *et al.* Pure red-cell aplasia due to parvovirus B19 infection in a patient with AIDS-related complex. *Ann Med* **24**, 137 (1992).
- 143 Azzi, A., Fanci, R., Ciappi, S., Zakrzewska, K. & Bosi, A. Human parvovirus B19 infection in bone marrow transplantation patients. *Am J Hematol* **44**, 207-209 (1993).
- 144 Corral, D. A. *et al.* Parvovirus B19 infection causing pure red cell aplasia in a recipient of pediatric donor kidneys. *Transplantation* **55**, 427-430 (1993).
- 145 Nour, B. *et al.* Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients. *Transplantation* **56**, 835-838 (1993).
- 146 de Jong, E. P., Walther, F. J., Kroes, A. C. & Oepkes, D. Parvovirus B19 infection in pregnancy: new insights and management. *Prenat Diagn* **31**, 419-425 (2011).  
<https://doi.org:10.1002/pd.2714>
- 147 Brown, K. E. *et al.* Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet* **343**, 895-896 (1994).
- 148 CE, G. & DOC, A. Parvovirus b19 infection in pregnancy - A review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **264** (2021).  
<https://doi.org:10.1016/j.ejogrb.2021.07.046>
- 149 Wright, C., Hinchliffe, S. A. & Taylor, C. Fetal pathology in intrauterine death due to parvovirus B19 infection. *Br J Obstet Gynaecol* **103**, 133-136 (1996).
- 150 Morey, A. L., Keeling, J. W., Porter, H. J. & Fleming, K. A. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol* **99**, 566-574 (1992).
- 151 Skjöldebrand-Sparre, L. *et al.* Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG* **107**, 476-480 (2000).



- 152 Bruu, A. L. & Flugsrud, L. B. [Erythema infectiosum in pregnancy. A follow-up of  
children after 2 years]. *Tidsskr Nor Laegeforen* **114**, 308-310 (1994).
- 153 Harger, J. H., Adler, S. P., Koch, W. C. & Harger, G. F. Prospective evaluation of 618  
pregnant women exposed to parvovirus B19: risks and symptoms. *Obstet Gynecol* **91**,  
413-420 (1998).
- 154 Kerr, J. R., O'Neill, H. J., Coyle, P. V. & Thompson, W. An outbreak of parvovirus B19  
infection; a study of clinical manifestations and the incidence of fetal loss. *Ir J Med Sci*  
**163**, 65-67 (1994).
- 155 Eis-Hübinger, A. M., Dieck, D., Schild, R., Hansmann, M. & Schneeweis, K. E.  
Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Intervirology* **41**, 178-184 (1998).  
<https://doi.org/24933>
- 156 Yaegashi, N. *et al.* Characterization of monoclonal antibodies against human parvovirus  
B19. *Microbiol Immunol* **33**, 561-567 (1989).
- 157 Tolfvenstam, T. & Broliden, K. Parvovirus B19 infection. *Semin Fetal Neonatal Med*  
**14**, 218-221 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.01.007>
- 158 Enders, G. & Biber, M. Parvovirus B19 infections in pregnancy. *Behring Inst Mitt*, 74-  
78 (1990).
- 159 Essary, L. R., Vnencak-Jones, C. L., Manning, S. S., Olson, S. J. & Johnson, J. E.  
Frequency of parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis and utility of three  
diagnostic methods. *Hum Pathol* **29**, 696-701 (1998).
- 160 Miller, E., Fairley, C. K., Cohen, B. J. & Seng, C. Immediate and long term outcome of  
human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* **105**, 174-178  
(1998).
- 161 Yaegashi, N. *et al.* Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in  
Japan. *J Infect* **38**, 30-35 (1999).
- 162 Yaegashi, N. *et al.* The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related  
hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. *J*  
*Infect* **37**, 28-35 (1998).
- 163 Bascietto, F. *et al.* Outcome of fetuses with congenital parvovirus B19 infection:  
systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* **52**, 569-576 (2018).  
<https://doi.org/10.1002/uog.19092>
- 164 Lamont, R. F. *et al.* Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG* **118**, 175-186  
(2011). <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02749.x>
- 165 Dembinski, J. *et al.* Neurodevelopmental outcome after intrauterine red cell transfusion  
for parvovirus B19-induced fetal hydrops. *BJOG* **109**, 1232-1234 (2002).
- 166 Nagel, H. T., de Haan, T. R., Vandenbussche, F. P., Oepkes, D. & Walther, F. J. Long-  
term outcome after fetal transfusion for hydrops associated with parvovirus B19  
infection. *Obstet Gynecol* **109**, 42-47 (2007).  
<https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000249611.67873.94>
- 167 Mihaly, I. *et al.* [Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011].  
*Orv Hetil* **153**, 1948-1957 (2012). <https://doi.org/10.1556/oh.2012.29447>
- 168 Bihari, C. *et al.* Parvovirus b19 associated hepatitis. *Hepat Res Treat* **2013**, 472027  
(2013). <https://doi.org/10.1155/2013/472027>
- 169 Martínez González, J., Senosiain Lalastra, C., Mesonero Gismero, F. & Moreira  
Vicente, V. [An exceptional cause of acute hepatitis in an adult: parvovirus B19].  
*Gastroenterol Hepatol* **35**, 697-699 (2012).  
<https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.04.012>
- 170 Sun, L. & Zhang, J. C. Acute fulminant hepatitis with bone marrow failure in an adult  
due to parvovirus B19 infection. *Hepatology* **55**, 329-330 (2012).  
<https://doi.org/10.1002/hep.24720>
- 171 Larsen, L. [Parvovirus B19 acute hepatitis in an immunocompetent adult]. *Ugeskr*  
*Laeger* **173**, 2719-2720 (2011).



- 172 Hatakka, A. *et al.* Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol* **49**, 3422-3424 (2011). <https://doi.org:10.1128/JCM.00575-11>
- 173 Yang, S. H., Lin, L. W., Fang, Y. J., Cheng, A. L. & Kuo, S. H. Parvovirus B19 infection-related acute hepatitis after rituximab-containing regimen for treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hematol* **91**, 291-294 (2012). <https://doi.org:10.1007/s00277-011-1238-8>
- 174 Sun, L., Zhang, J. C. & Jia, Z. S. Association of parvovirus B19 infection with acute icteric hepatitis in adults. *Scand J Infect Dis* **43**, 547-549 (2011). <https://doi.org:10.3109/00365548.2011.554856>
- 175 Al Nahdi, N., Wiesinger, H., Sutherland, H. & Yoshida, E. M. Recurrent idiopathic acute hepatitis-associated aplastic anemia/pancytopenia fourteen years after initial episode. *Ann Hepatol* **9**, 468-470 (2010).
- 176 Kim, B. J., Yoo, K. H., Li, K. & Kim, M. N. Parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis in infant. *Pediatr Infect Dis J* **28**, 667 (2009). <https://doi.org:10.1097/INF.0b013e3181a645bd>
- 177 Shan, Y. S. *et al.* Fibrosing cholestatic hepatitis possibly related to persistent parvovirus B19 infection in a renal transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 2420-2422 (2001).
- 178 Dwivedi, M., Manocha, H., Tiwari, S., Tripathi, G. & Dhole, T. N. Coinfection of parvovirus b19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. *Pediatr Infect Dis J* **28**, 649-650 (2009). <https://doi.org:10.1097/INF.0b013e318198d05c>
- 179 Mogensen, T. H., Jensen, J. M., Hamilton-Dutoit, S. & Larsen, C. S. Chronic hepatitis caused by persistent parvovirus B19 infection. *BMC Infect Dis* **10**, 246 (2010). <https://doi.org:10.1186/1471-2334-10-246>
- 180 Pongratz, G. *et al.* Persistent parvovirus B19 infection detected by specific CD4+ T-cell responses in a patient with hepatitis and polyarthritis. *J Intern Med* **266**, 296-301 (2009). <https://doi.org:10.1111/j.1365-2796.2009.02117.x>
- 181 Wang, C. *et al.* Intrahepatic long-term persistence of parvovirus B19 and its role in chronic viral hepatitis. *J Med Virol* **81**, 2079-2088 (2009). <https://doi.org:10.1002/jmv.21638>
- 182 Krygier, D. S. *et al.* Parvovirus B19 induced hepatic failure in an adult requiring liver transplantation. *World J Gastroenterol* **15**, 4067-4069 (2009).
- 183 Osugi, Y. *et al.* Antithymocyte globulin and cyclosporine for treatment of 44 children with hepatitis associated aplastic anemia. (2007). <https://doi.org:10.3324/haematol.11359>
- 184 Rauff, B. *et al.* Hepatitis associated aplastic anemia: a review. *Virol J* **8**, 87 (2011). <https://doi.org:10.1186/1743-422x-8-87>
- 185 Morita, E., Nakashima, A., Asao, H., Sato, H. & Sugamura, K. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol* **77**, 2915-2921 (2003).
- 186 Cooling, L. L., Koerner, T. A. & Naides, S. J. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis* **172**, 1198-1205 (1995).
- 187 Onguru, P. *et al.* Glomerulonephritis associating parvovirus B19 infection. *Ren Fail* **28**, 85-88 (2006).
- 188 Ieiri, N., Hotta, O. & Taguma, Y. Characteristics of acute glomerulonephritis associated with human parvovirus B19 infection. *Clin Nephrol* **64**, 249-257 (2005).
- 189 Ohtomo, Y. *et al.* Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection. *Pediatr Nephrol* **18**, 280-282 (2003). <https://doi.org:10.1007/s00467-002-1056-2>
- 190 Iwafuchi, Y. *et al.* Acute endocapillary proliferative glomerulonephritis associated with human parvovirus B19 infection. *Clin Nephrol* **57**, 246-250 (2002).

- 191 Moudgil, A. *et al.* Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* **59**, 2126-2133 (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00727.x>
- 192 Komatsuda, A. *et al.* Endocapillary proliferative glomerulonephritis in a patient with parvovirus B19 infection. *Am J Kidney Dis* **36**, 851-854 (2000).
- 193 Nakazawa, T. *et al.* Acute glomerulonephritis after human parvovirus B19 infection. *Am J Kidney Dis* **35**, E31 (2000).
- 194 Tanawattanacharoen, S., Falk, R. J., Jennette, J. C. & Kopp, J. B. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* **35**, 1166-1174 (2000).
- 195 Díaz, F. & Collazos, J. Glomerulonephritis and Henoch-Schoenlein purpura associated with acute parvovirus B19 infection. *Clin Nephrol* **53**, 237-238 (2000).
- 196 Tolaymat, A., Al Mousily, F., MacWilliam, K., Lammert, N. & Freeman, B. Parvovirus glomerulonephritis in a patient with sickle cell disease. *Pediatr Nephrol* **13**, 340-342 (1999).
- 197 Murer, L. *et al.* Thrombotic microangiopathy associated with parvovirus B 19 infection after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* **11**, 1132-1137 (2000).
- 198 Bleumink, G. S., Halma, C., van Vliet, A. C., de Jong, G. M. & van Bommel, E. F. Human parvovirus B19 and renal disease? *Neth J Med* **56**, 163-165 (2000).
- 199 Mori, Y. *et al.* Association of parvovirus B19 infection with acute glomerulonephritis in healthy adults: case report and review of the literature. *Clin Nephrol* **57**, 69-73 (2002).
- 200 Takeda, S., Takaeda, C., Takazakura, E. & Haratake, J. Renal involvement induced by human parvovirus B19 infection. *Nephron* **89**, 280-285 (2001). <https://doi.org/46086>
- 201 Taylor, G., Drachenberg, C. & Faris-Young, S. Renal involvement of human parvovirus B19 in an immunocompetent host. *Clin Infect Dis* **32**, 167-169 (2001). <https://doi.org/10.1086/317556>
- 202 Wierenga, K. J. *et al.* Glomerulonephritis after human parvovirus infection in homozygous sickle-cell disease. *Lancet* **346**, 475-476 (1995).
- 203 Moudgil, A. *et al.* Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients: treatment with intravenous immunoglobulin. *Transplantation* **64**, 1847-1850 (1997).
- 204 Waldman, M. & Kopp, J. B. Parvovirus B19 and the kidney. *Clin J Am Soc Nephrol* **2 Suppl 1**, S47-56 (2007). <https://doi.org/10.2215/CJN.01060307>
- 205 Duranay, M. *et al.* Parvovirus B19 infection and unresponsiveness to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **13**, 779-780 (1998).
- 206 Arzouk, N. *et al.* Parvovirus B19-induced anemia in renal transplantation: a role for rHuEPO in resistance to classical treatment. *Transpl Int* **19**, 166-169 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2005.00247.x>
- 207 Ozeki, M., Fukushima, T., Ohzeki, M., Sasaki, T. & Kashihara, N. A nosocomial parvovirus B19 infection-induced transient aplastic crisis in a patient with chronic renal failure. *Clin Nephrol* **65**, 141-143 (2006).
- 208 Yu, M. Y. *et al.* Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples. *Transfusion* **50**, 1712-1721 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02591.x>
- 209 Broliden, K. Parvovirus B19 infection in pediatric solid-organ and bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* **5**, 320-330 (2001).
- 210 Bertoni, E. *et al.* Aplastic anemia due to B19 parvovirus infection in cadaveric renal transplant recipients: an underestimated infectious disease in the immunocompromised host. *J Nephrol* **10**, 152-156 (1997).
- 211 Marchand, S. *et al.* Human parvovirus B19 infection in organ transplant recipients. *Clin Transplant* **13**, 17-24 (1999).

- 212 Geetha, D., Zachary, J. B., Baldado, H. M., Kronz, J. D. & Kraus, E. S. Pure red cell aplasia caused by Parvovirus B19 infection in solid organ transplant recipients: a case report and review of literature. *Clin Transplant* **14**, 586-591 (2000).
- 213 Eid, A. J., Brown, R. A., Patel, R. & Razonable, R. R. Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases. *Clin Infect Dis* **43**, 40-48 (2006). <https://doi.org:10.1086/504812>
- 214 Ki, C. S. *et al.* Incidence and clinical significance of human parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients. *Clin Transplant* **19**, 751-755 (2005). <https://doi.org:10.1111/j.1399-0012.2005.00415.x>
- 215 Zolnourian, Z. R. *et al.* Parvovirus B19 in kidney transplant patients. *Transplantation* **69**, 2198-2202 (2000).
- 216 Dennert, R., Crijns, H. J. & Heymans, S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* **29**, 2073-2082 (2008). <https://doi.org:10.1093/eurheartj/ehn296>
- 217 Kühl, U. *et al.* Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* **112**, 1965-1970 (2005). <https://doi.org:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.548156>
- 218 Moimas, S. *et al.* Idiopathic dilated cardiomyopathy and persistent viral infection: lack of association in a controlled study using a quantitative assay. *Heart Lung Circ* **21**, 787-793 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.hlc.2012.07.013>
- 219 Pankuweit, S. *et al.* Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* **34**, 497-503 (2003).
- 220 Kühl, U. *et al.* High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* **111**, 887-893 (2005). <https://doi.org:10.1161/01.CIR.0000155616.07901.35>
- 221 Schowengerdt, K. O. *et al.* Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation* **96**, 3549-3554 (1997).
- 222 Stewart, G. C. *et al.* Myocardial parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure. *Circ Heart Fail* **4**, 71-78 (2011). <https://doi.org:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958249>
- 223 Bültmann, B. D. *et al.* Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol* **34**, 92-95 (2003). <https://doi.org:10.1053/hupa.2003.48>
- 224 Murry, C. E., Jerome, K. R. & Reichenbach, D. D. Fatal parvovirus myocarditis in a 5-year-old girl. *Hum Pathol* **32**, 342-345 (2001). <https://doi.org:10.1053/hupa.2001.22743>
- 225 Schenk, T., Enders, M., Pollak, S., Hahn, R. & Huzly, D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J Clin Microbiol* **47**, 106-110 (2009). <https://doi.org:10.1128/JCM.01672-08>
- 226 Lotze, U. *et al.* Low level myocardial parvovirus B19 persistence is a frequent finding in patients with heart disease but unrelated to ongoing myocardial injury. *J Med Virol* **82**, 1449-1457 (2010). <https://doi.org:10.1002/jmv.21821>
- 227 Zakrzewska, K. *et al.* Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Res* **114**, 1-5 (2005). <https://doi.org:10.1016/j.virusres.2005.05.003>
- 228 Pozzuto, T. *et al.* Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. *Virology* **411**, 50-64 (2011). <https://doi.org:10.1016/j.virol.2010.12.019>
- 229 Bock, C. T., Klingel, K. & Kandolf, R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med* **362**, 1248-1249 (2010). <https://doi.org:10.1056/NEJMc0911362>
- 230 Klingel, K. *et al.* Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* **193**, 101-107 (2004). <https://doi.org:10.1007/s00430-003-0190-1>

- 231 Verdonshot, J. *et al.* Relevance of cardiac parvovirus B19 in myocarditis and dilated cardiomyopathy: review of the literature. *Eur J Heart Fail* **18**, 1430-1441 (2016). <https://doi.org:10.1002/ejhf.665>
- 232 Heegaard, E. D., Madsen, H. O. & Schmiegelow, K. Transient pancytopenia preceding acute lymphoblastic leukaemia (pre-ALL) precipitated by parvovirus B19. *Br J Haematol* **114**, 810-813 (2001).
- 233 Posfay-Barbe, K. M. M., M. G. Parvovirus B19 in organ transplant recipients : Current Opinion in Organ Transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* **8**, 283-287 (2003).
- 234 Schild, R. L. *et al.* Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* **13**, 161-166 (1999). <https://doi.org:10.1046/j.1469-0705.1999.13030161.x>
- 235 Kurtzman, G. *et al.* Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med* **321**, 519-523 (1989). <https://doi.org:10.1056/NEJM198908243210807>
- 236 Bonvicini, F., Bua, G., Manaresi, E. & Gallinella, G. Antiviral effect of cidofovir on parvovirus B19 replication. *Antiviral Res* **113**, 11-18 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.antiviral.2014.11.004>
- 237 Bernstein, D. I. *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* **29**, 7357-7363 (2011). <https://doi.org:10.1016/j.vaccine.2011.07.080>
- 238 Chandramouli, S. *et al.* Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. *Vaccine* **31**, 3872-3878 (2013). <https://doi.org:10.1016/j.vaccine.2013.06.062>
- 239 Penkert, R. R., Hankins, J. S., Young, N. S. & Hurwitz, J. L. Vaccine Design Informed by Virus-Induced Immunity. *Viral Immunol* **33**, 342-350 (2020). <https://doi.org:10.1089/vim.2019.0138>
- 240 Das, P., Chatterjee, K., Chattopadhyay, N. R. & Choudhuri, T. Evolutionary aspects of Parvovirus B-19V associated diseases and their pathogenesis patterns with an emphasis on vaccine development. *Virusdisease* **30**, 32-42 (2019). <https://doi.org:10.1007/s13337-019-00525-6>
- 241 Penkert, R. R. *et al.* Saccharomyces cerevisiae-derived virus-like particle parvovirus B19 vaccine elicits binding and neutralizing antibodies in a mouse model for sickle cell disease. *Vaccine* **35**, 3615-3620 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.vaccine.2017.05.022>
- 242 Butchko, A. R. & Jordan, J. A. Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *J Clin Microbiol* **42**, 3191-3195 (2004). <https://doi.org:10.1128/JCM.42.7.3191-3195.2004>
- 243 Bruu, A. L. & Nordbø, S. A. Evaluation of five commercial tests for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. *J Clin Microbiol* **33**, 1363-1365 (1995).
- 244 Tolfvenstam, T., Rudén, U. & Broliden, K. Evaluation of serological assays for identification of parvovirus B19 immunoglobulin M. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 147-150 (1996).
- 245 Patou, G. & Ayliffe, U. Evaluation of commercial enzyme linked immunosorbent assay for detection of B19 parvovirus IgM and IgG. *J Clin Pathol* **44**, 831-834 (1991).
- 246 Maple, P. A. *et al.* Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. *J Clin Microbiol* **52**, 947-956 (2014). <https://doi.org:10.1128/JCM.02613-13>
- 247 Salimans, M. M., van de Rijke, F. M., Raap, A. K. & van Elsacker-Niele, A. M. Detection of parvovirus B19 DNA in fetal tissues by in situ hybridisation and polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* **42**, 525-530 (1989).



- 248 Peterlana, D., Puccetti, A., Corrocher, R. & Lunardi, C. Serologic and molecular detection of human Parvovirus B19 infection. *Clin Chim Acta* **372**, 14-23 (2006). <https://doi.org:10.1016/j.cca.2006.04.018>
- 249 Slavov, S. N., Kashima, S., Pinto, A. C. & Covas, D. T. Human parvovirus B19: general considerations and impact on patients with sickle-cell disease and thalassemia and on blood transfusions. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**, 247-262 (2011). <https://doi.org:10.1111/j.1574-695X.2011.00819.x>
- 250 Shade, R. O., Blundell, M. C., Cotmore, S. F., Tattersall, P. & Astell, C. R. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol* **58**, 921-936 (1986).
- 251 Sevall, J. S., Ritenhous, J. & Peter, J. B. Laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. *J Clin Lab Anal* **6**, 171-175 (1992).
- 252 Kovacs, B. W., Carlson, D. E., Shahbahrami, B. & Platt, L. D. Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* **167**, 461-466 (1992).
- 253 Musiani, M. *et al.* Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. *J Med Virol* **40**, 157-160 (1993).
- 254 Gallinella, G. *et al.* Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J Med Virol* **71**, 135-139 (2003). <https://doi.org:10.1002/jmv.10452>
- 255 Patou, G., Pillay, D., Myint, S. & Pattison, J. Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J Clin Microbiol* **31**, 540-546 (1993).
- 256 Carrière, C., Boulanger, P. & Delsert, C. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. *J Virol Methods* **44**, 221-234 (1993).
- 257 Braham, S., Gandhi, J., Beard, S. & Cohen, B. Evaluation of the Roche LightCycler parvovirus B19 quantification kit for the diagnosis of parvovirus B19 infections. *J Clin Virol* **31**, 5-10 (2004). <https://doi.org:10.1016/j.jcv.2003.10.005>
- 258 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* **92**, 183-191 (2001).
- 259 Manaresi, E. *et al.* Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. *J Med Virol* **67**, 275-281 (2002). <https://doi.org:10.1002/jmv.2218>
- 260 Schorling, S., Schalasta, G., Enders, G. & Zauke, M. Quantification of parvovirus B19 DNA using COBAS AmpliPrep automated sample preparation and LightCycler real-time PCR. *J Mol Diagn* **6**, 37-41 (2004). [https://doi.org:10.1016/S1525-1578\(10\)60489-8](https://doi.org:10.1016/S1525-1578(10)60489-8)
- 261 Knöll, A. *et al.* Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Med Virol* **67**, 259-266 (2002). <https://doi.org:10.1002/jmv.2216>
- 262 Molenaar-de Backer, M. W. *et al.* Detection of parvovirus B19 DNA in blood: Viruses or DNA remnants? *J Clin Virol* **84**, 19-23 (2016). <https://doi.org:10.1016/j.jcv.2016.09.004>
- 263 Reber, U., Moser, O., Dilloo, D. & Eis-Hubinger, A. M. On the utility of the benzonase treatment for correct laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. *J Clin Virol* **95**, 10-11 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.jcv.2017.07.017>
- 264 S, O. H., Lee, L., Maunula. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase - Oristo - 2018 - Journal of Applied



- Microbiology - Wiley Online Library. *Journal of Applied Microbiology* **124**, 1008-1016 (2018). <https://doi.org:10.1111/jam.13737>
- 265 Qiu, J., Soderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev* **30**, 43-113 (2017). <https://doi.org:10.1128/cmr.00040-16>
- 266 Koch, W. C. & Adler, S. P. Human parvovirus B19 infections in women of childbearing age and within families. *Pediatr Infect Dis J* **8**, 83-87 (1989).
- 267 Abarca, K., Cohen, B. J. & Vial, P. A. Seroprevalence of parvovirus B19 in urban Chilean children and young adults, 1990 and 1996. *Epidemiol Infect* **128**, 59-62 (2002).
- 268 Sodja, I. *et al.* [Seroprevalence of IgG antibodies against parvovirus B19 in the population of the Czech Republic]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* **44**, 171-174 (1995).
- 269 Abraham, M. *et al.* A pilot study on the seroprevalence of parvovirus B19 infection. *Indian J Med Res* **115**, 139-143 (2002).
- 270 Anderson, L. J. *et al.* Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **24**, 522-526 (1986).
- 271 Nunoue, T., Okochi, K., Mortimer, P. P. & Cohen, B. J. Human parvovirus (B19) and erythema infectiosum. *J Pediatr* **107**, 38-40 (1985).
- 272 Güerri, M. L., Prior, C., Merino, R. & Zapico, R. [Seroprevalence of parvovirus B19 in our area and its distribution by ages and sexes]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **18**, 243-244 (2000).
- 273 Cohen, B. J. & Buckley, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol* **25**, 151-153 (1988). <https://doi.org:10.1099/00222615-25-2-151>
- 274 Gay, N. J. *et al.* Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: how many women are infected in pregnancy? *Commun Dis Rep CDR Rev* **4**, R104-107 (1994).
- 275 de Freitas, R. B. *et al.* Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil. *J Med Virol* **32**, 203-208 (1990).
- 276 de Freitas, R. B. *et al.* Parvovirus B19 antibodies in sera of patients with unexplained exanthemata from Belém, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **88**, 497-499 (1993).
- 277 Huatuco, E. M. *et al.* Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* **42**, 443-449 (2008).
- 278 Oliveira, S. A. *et al.* The aetiology of maculopapular rash diseases in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil: implications for measles surveillance. *Epidemiol Infect* **127**, 509-516 (2001).
- 279 Anderson, L. J. Role of parvovirus B19 in human disease. *Pediatr Infect Dis J* **6**, 711-718 (1987).
- 280 Anderson, L. J. *et al.* Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst Mitt*, 60-63 (1990).
- 281 Cartter, M. L. *et al.* Occupational risk factors for infection with parvovirus B19 among pregnant women. *J Infect Dis* **163**, 282-285 (1991).
- 282 Gillespie, S. M. *et al.* Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day-care personnel during an outbreak of erythema infectiosum. *JAMA* **263**, 2061-2065 (1990).
- 283 Koziol, D. E., Kurtzman, G., Ayub, J., Young, N. S. & Henderson, D. K. Nosocomial human parvovirus B19 infection: lack of transmission from a chronically infected patient to hospital staff. *Infect Control Hosp Epidemiol* **13**, 343-348 (1992).
- 284 Miyamoto, K. *et al.* Outbreak of human parvovirus B19 in hospital workers. *J Hosp Infect* **45**, 238-241 (2000). <https://doi.org:10.1053/jhin.2000.0771>
- 285 Cohen, B. J., Couroucé, A. M., Schwarz, T. F., Okochi, K. & Kurtzman, G. J. Laboratory infection with parvovirus B19. *J Clin Pathol* **41**, 1027-1028 (1988).
- 286 Cohen, B. J. & Brown, K. E. Laboratory infection with human parvovirus B19. *J Infect* **24**, 113-114 (1992).

- 287 Shiraishi, H., Sasaki, T., Nakamura, M., Yaegashi, N. & Sugamura, K. Laboratory  
infection with human parvovirus B19. *J Infect* **22**, 308-310 (1991).
- 288 Kleinman, S. H. *et al.* Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in  
blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion*  
**47**, 1756-1764 (2007). <https://doi.org:10.1111/j.1537-2995.2007.01341.x>
- 289 Slavov, S. N. *et al.* Frequent human parvovirus B19 DNA occurrence and high  
seroprevalence in haemophilic patients from a non-metropolitan blood centre, Brazil.  
*Transfus Med* **24**, 130-132 (2014). <https://doi.org:10.1111/tme.12113>
- 290 Candotti, D., Etiz, N., Parsyan, A. & Allain, J. P. Identification and characterization of  
persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol* **78**, 12169-  
12178 (2004). <https://doi.org:10.1128/JVI.78.22.12169-12178.2004>
- 291 Marano, G. *et al.* Human Parvovirus B19 and blood product safety: a tale of twenty  
years of improvements. *Blood Transfus* **13**, 184-196 (2015).  
<https://doi.org:10.2450/2014.0174.14>
- 292 Jordan, J., Tiangco, B., Kiss, J. & Koch, W. Human parvovirus B19: prevalence of viral  
DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox  
Sang* **75**, 97-102 (1998).
- 293 Rollag, H., Solheim, B. G. & Svennevig, J. L. Viral safety of blood derivatives by  
immune neutralization. *Vox Sang* **74 Suppl 1**, 213-217 (1998).
- 294 Heegaard, E. D. & Laub Petersen, B. Parvovirus B19 transmitted by bone marrow. *Br  
J Haematol* **111**, 659-661 (2000).
- 295 Cohen, B. J. *et al.* Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow  
transplant patient after platelet transfusion. *Transfusion* **37**, 947-952 (1997).
- 296 Erdman, D. D., Anderson, B. C., Török, T. J., Finkel, T. H. & Anderson, L. J. Possible  
transmission of parvovirus B19 from intravenous immune globulin. *J Med Virol* **53**,  
233-236 (1997).
- 297 Hino, M. *et al.* Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant  
used during surgery. *Br J Haematol* **108**, 194-195 (2000).
- 298 Azzi, A., Morfini, M. & Mannucci, P. M. The transfusion-associated transmission of  
parvovirus B19. *Transfus Med Rev* **13**, 194-204 (1999).
- 299 Magalhães, I. M. *Avaliação da técnica de reação em cadeia da polimerase para  
detecção do herpesvírus humano tipo 6 em amostras de saliva e soro de crianças com  
diagnóstico sorológico de infecção primária pelo HHV-6* Mestrado thesis, Universidade  
Federal Fluminense, (2010).
- 300 Alonso, A., Distefano, A., Carlino, O. & Polito, A. [Exanthematous outbreak caused by  
human parvovirus B19 in a school in Banderoló, Argentina]. *Rev Argent Microbiol* **35**,  
171-174 (2003).
- 301 Oliveira, M. J. *et al.* [Frequency of measles, rubella, dengue and erythema infectiosum  
among suspected cases of measles and rubella in the State of Pernambuco between 2001  
and 2004]. *Rev Soc Bras Med Trop* **41**, 338-344 (2008).
- 302 Vega Alonso, T. *et al.* Incidencia y características clínicas de los exantemas  
maculopapulares de etiología viral. *Atención Primaria* **32**, 517-523 (2003).
- 303 Moreira, J., Bressan, C. S., Brasil, P. & Siqueira, A. M. Epidemiology of acute febrile  
illness in Latin America. *Clin Microbiol Infect* **24**, 827-835 (2018).  
<https://doi.org:10.1016/j.cmi.2018.05.001>
- 304 Gesualdo, G. D. M., Ana Laura Costa. Rusa, Suzana Gabriela. Napoleão, Anamaria  
Alves. Figueiredo, Rosely Moralez. Melhado, Vivian Ramos. Orlandi, Fabiana de  
Souza. FACTORS ASSOCIATED WITH THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS  
UNDERGOING HEMODIALYSIS. *Texto & Contexto - Enfermagem* **26** (2017).  
<https://doi.org:http://dx.doi.org/10.1590/0104-07072017005600015>
- 305 Naghettini, A. V. R. R. D., Regina M.B. Martin, Jarbas Doles, Bart Vanderborcht, Clara  
F.T. Yoshida e Caroline Rouzere. SOROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE

- C NA POPULAÇÃO EM DIÁLISE DE GOIÂNIA, GO. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **30** (1997). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821997000200005>
- 306 Ho, J. K. *et al.* Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. *Can J Gastroenterol* **19**, 161-162 (2005).
- 307 Pardi, D. S., Romero, Y., Mertz, L. E. & Douglas, D. D. Hepatitis-associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection: a report of two cases and a review of the literature. *Am J Gastroenterol* **93**, 468-470 (1998). [https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.468\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.468_1.x)
- 308 Langnas, A. N., Markin, R. S., Cattral, M. S. & Naides, S. J. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* **22**, 1661-1665 (1995).
- 309 Abe, K. *et al.* Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci* **4**, 105-109 (2007).
- 310 Corcioli, F. *et al.* Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol* **80**, 2005-2011 (2008). <https://doi.org/10.1002/jmv.21289>
- 311 Söderlund-Venermo, M., Hokynar, K., Nieminen, J., Rautakorpi, H. & Hedman, K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol Biol (Paris)* **50**, 307-316 (2002).
- 312 Leon, L. A. *et al.* Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **111**, 258-266 (2016). <https://doi.org/10.1590/0074-02760160013>
- 313 ANVISA. Resolução RE número 897 de 29/05/2003. (2003).
- 314 Koppelman, M. H. *et al.* Multicenter evaluation of a commercial multiplex polymerase chain reaction test for screening plasma donations for parvovirus B19 DNA and hepatitis A virus RNA. *Transfusion* **52**, 1498-1508 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03705.x>
- 315 Liefeldt, L. *et al.* Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol* **75**, 161-169 (2005). <https://doi.org/10.1002/jmv.20251>
- 316 Molenaar-de Backer, M. W., de Waal, M., Sjerps, M. C. & Koppelman, M. H. Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. *Transfusion* **56**, 440-448 (2016). <https://doi.org/10.1111/trf.13334>
- 317 Burd, E. M. in *Clin Microbiol Rev* Vol. 23 550-576 (2010).
- 318 Fernandes-Monteiro, A. G. *et al.* New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Hum Vaccin Immunother* **11**, 1865-1871 (2015). <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.990854>
- 319 Alves, A. D. R., Cubel Garcia, R. C. N., Cruz, O. G., Pinto, M. A. & Amado Leon, L. A. Quantitative real-time PCR for differential diagnostics of parvovirus B19 infection in acute liver failure patients. *Expert Rev Mol Diagn* **19**, 259-266 (2019). <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1582333>
- 320 Dobec, M., Juchler, A., Flaviano, A. & Kaeppli, F. Prolonged parvovirus b19 viremia in spite of neutralizing antibodies after erythema infectiosum in pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* **63**, 53-54 (2007). <https://doi.org/10.1159/000095394>
- 321 Juhl, D. & Hennig, H. Parvovirus B19: What Is the Relevance in Transfusion Medicine? *Front Med (Lausanne)* **5**, 4 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00004>

- 322 Eis-Hübinger, A. M. *et al.* Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J Med Virol* **65**, 395-401 (2001).
- 323 Naides, S. J., Karetnyi, Y. V., Cooling, L. L., Mark, R. S. & Langnas, A. N. Human parvovirus B19 infection and hepatitis. *Lancet* **347**, 1563-1564 (1996).
- 324 Karetnyi, Y. V., Beck, P. R., Markin, R. S., Langnas, A. N. & Naides, S. J. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch Virol* **144**, 1713-1724 (1999).
- 325 Bonvicini, F. *et al.* Functional analysis and quantitative determination of the expression profile of human parvovirus B19. *Virology* **381**, 168-177 (2008). <https://doi.org:10.1016/j.virol.2008.09.002>
- 326 Kishore, J. & Sen, M. Parvovirus B19-induced thrombocytopenia and anemia in a child with fatal fulminant hepatic failure coinfecting with hepatitis A and E viruses. *J Trop Pediatr* **55**, 335-337 (2009). <https://doi.org:10.1093/tropej/fmp004>
- 327 Brown, K. E. & Young, N. S. Parvoviruses and bone marrow failure. *Stem Cells* **14**, 151-163 (1996). <https://doi.org:10.1002/stem.140151>
- 328 Pereira, R. F. *et al.* Clinical features and laboratory findings of human parvovirus B19 in human immunodeficiency virus-infected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **109**, 168-173 (2014).
- 329 Ferry, T. *et al.* Infrequent replication of parvovirus B19 and erythrovirus genotypes 2 and 3 among HIV-infected patients with chronic anemia. *Clin Infect Dis* **50**, 115-118 (2010). <https://doi.org:10.1086/649004>
- 330 Sharif, A. *et al.* Frequency and Genotype of Human Parvovirus B19 among Iranian Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients. *Intervirol* **59**, 179-185 (2016). <https://doi.org:10.1159/000455124>
- 331 Azadmanesh, K. *et al.* Frequency and genotype of human parvovirus B19 among Iranian patients infected with HIV. *J Med Virol* **87**, 1124-1129 (2015). <https://doi.org:10.1002/jmv.24169>
- 332 Alves, M. T. *et al.* Parvovirus B19 (B19) and cytomegalovirus (CMV) infections and anti-erythropoietin (anti-EPO) antibodies in patients on dialysis hypo-responsive to erythropoietin therapy. *Clin Chim Acta* **431**, 52-57 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.cca.2014.01.039>
- 333 Slavov, S. N., Otaguiri, K. K., Covas, D. T. & Kashima, S. Prevalence and Viral Load of Human Parvovirus B19 (B19V) Among Blood Donors in South-East Brazil. *Indian J Hematol Blood Transfus* **32**, 323-325 (2016). <https://doi.org:10.1007/s12288-015-0607-1>
- 334 Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* **389**, 1238-1252 (2017). [https://doi.org:10.1016/s0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org:10.1016/s0140-6736(16)32064-5)
- 335 Seetha, D. *et al.* Molecular-genetic characterization of human parvovirus B19 prevalent in Kerala State, India. *Virology Journal* **18**, 1-8 (2021). <https://doi.org:doi:10.1186/s12985-021-01569-1>
- 336 MA, Y., JM, H., GV, S., EO, S. & CP, M. Human parvovirus B19 surveillance in patients with rash and fever from Belarus. *Journal of medical virology* **84** (2012). <https://doi.org:10.1002/jmv.23294>
- 337 Ramesh, A. *et al.* Metagenomic next-generation sequencing of samples from pediatric febrile illness in Tororo, Uganda. *PLoS One* **14**, e0218318 (2019). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0218318>
- 338 Garcia, C. & Leon, A. Human parvovirus B19: a review of clinical and epidemiological aspects in Brazil. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0123> (2020). <https://doi.org:10.2217/fmb-2020-0123>
- 339 Freitas, R. B., Monteiro, T. A. & Linhares, A. C. Outbreaks of human-herpes virus 6 (HHV-6) infection in day-care centers in Belém, Pará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **42**, 305-311 (2000).

- 340 Di Paola, N. *et al.* An Outbreak of Human Parvovirus B19 Hidden by Dengue Fever. *Clin Infect Dis* **68**, 810-817 (2019). <https://doi.org:10.1093/cid/ciy630>
- 341 Cubel, R. C. *et al.* Human parvovirus B19 infections among exanthematic diseases notified as measles. *Rev Soc Bras Med Trop* **30**, 15-20 (1997).
- 342 Oliveira, S. A. *et al.* Clinical and epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection in an urban area in Brazil (Niterói city area, State of Rio de Janeiro, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 965-970 (2002).
- 343 Wermelinger, M. C., Oelemann, W. M., Lima de Mendonça, M. C., Naveca, F. G. & von Hubinger, M. G. Detection of human parvovirus B19 infection: a study of 212 suspected cases in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol* **25**, 223-230 (2002).
- 344 Mendonça, M. C., Ribeiro, S. B., Couceiro, J. N. & von Hubinger, M. G. Parvovirus B19 infections in state of Rio de Janeiro, Brazil: 526 sera analyzed by IgM-enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 847-852 (2005). <https://doi.org:/S0074-02762005000800005>
- 345 Oliveira, M. I. *et al.* Genotype 1 of human parvovirus B19 in clinical cases. *Rev Assoc Med Bras (1992)* **63**, 224-228 (2017). <https://doi.org:10.1590/1806-9282.63.03.224>



## 7 PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

Trabalhos científicos publicados em período concomitante, mas não relacionados ao tema central da presente tese de doutorado.

### 7.1 Betaherpesvirus e falência hepática aguda

**Título:** *Multiplex qPCR facilitates identification of betaherpesviruses in patients with acute liver failure of unknown etiology*

**Autores:** Jéssica Vasques Raposo, Arthur Daniel Rocha Alves, Alexandre dos Santos da Silva, Damião Carlos dos Santos, Juliana Gil Melgaço, Otacílio Cruz Moreira, Marcelo Alves Pinto, Vanessa Salete de Paula.

**Revista:** Publicado no periódico *BMC Infectious Diseases*, 2019 (Fator de impacto = 3.090 e Qualis para Medicina 2 = B1).

### 7.2 Anticorpos equinos contra SARS-CoV-2

**Título:** *Polyclonal F(ab')<sub>2</sub> fragments of equine antibodies raised against the spike protein neutralize SARS-CoV-2 variants with high potency*

**Autores:** Luis Eduardo R. Cunha, Adilson A. Stolet, Marcelo A. Strauch, Victor A.R. Pereira, Carlos H. Dumard, Andre M.O. Gomes, Fábio L. Monteiro, Luiza M. Higa, Patrícia N.C. Souza, Juliana G. Fonseca, Francisco E. Pontes, Leonardo G.R. Meirelles, José W.M. Albuquerque, Carolina Q. Sacramento, Natalia Fintelman-Rodrigues, Tulio M. Lima, Renata G.F. Alvim, Federico F. Marsili, Marcella Moreira Caldeira, Russolina B. Zingali, Guilherme A.P. de Oliveira, Thiago M.L. Souza, Alexandre S. Silva, Rodrigo Muller, Daniela del Rosário Flores Rodrigues, Luciana Jesus da Costa, Arthur Daniel R. Alves, Marcelo Alves Pinto, Andréa C. Oliveira, Herbert L.M. Guedes, Amilcar Tanuri, Leda R. Castilho, Jerson L. Silva.

**Revista:** Publicado no periódico iScience, 2021 (Fator de impacto = 5.080 e Qualis para Medicina 2 = A2).

### 7.3 Detecção de SARS-CoV-2 em saliva

**Título:** *A Large Cohort Study of SARS-CoV-2 Detection in Saliva: A Non-Invasive Alternative Diagnostic Test for Patients with Bleeding Disorders*

**Autores:** Josiane Iole França Lopes, Carlos Alexandre da Costa Silva, Rodrigo Guimarães Cunha, Alexandra Martins Soares, Maria Esther Duarte Lopes, Orlando Carlos da Conceição Neto, Arthur Daniel Rocha Alves, Wagner Luis da Costa Nunes Pimentel Coelho, Luiz Amorim Filho, Luciane Almeida Amado Leon.

**Revista:** Publicado no periódico *Viruses*, 2021 (Fator de impacto = 5.048 e Qualis para Medicina 2 = A2)

## **8 ANEXOS**

### **8.1 Comitê de Ética em Pesquisa para os artigos 1, 2 e 3**

**Título:** Infecções por Parvovírus humano B19 associados a casos de hepatite aguda, crônica e fulminante

**CAAE:** 46074815.0.0000.5248

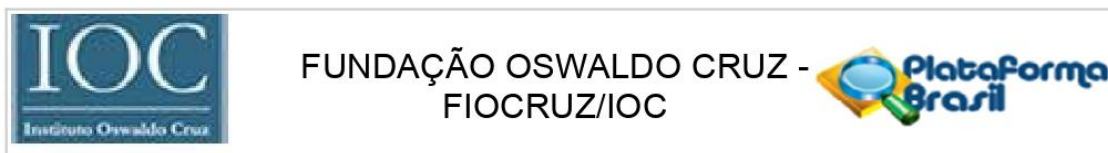
**Parecer aprovando o projeto:** 1.896.353

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** Infecções por Parvovírus humano B19 associados a casos de hepatite aguda, crônica e fulminante**Pesquisador:** Luciane Almeida Amado**Área Temática:****Versão:** 4**CAAE:** 46074815.0.0000.5248**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ**Patrocinador Principal:** Instituto Oswaldo Cruz-RJ**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 1.896.353**Apresentação do Projeto:**

As hepatites agudas e fulminantes se caracterizam pelo processo inflamatório hepático e podem originar-se de diversos agentes causais. Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) e parenteral (HBV e HCV) que podem estar associados com casos de hepatite fulminante com falência hepática. Contudo, estudos recentes relatam a ocorrência de hepatite aguda em pacientes adultos imunocompetentes infectados com parvovírus B19, com achados bioquímicos compatíveis com hepatites virais, entretanto, com testes sorológicos e moleculares negativos para detecção dos agentes comumente implicados na causa de hepatite (os vírus das hepatites A, B, C e E).

As manifestações hepáticas por B19 variam desde alterações bioquímicas no fígado à falência hepática fulminante (FHF). Pode acontecer mesmo que de maneira rara formas severas de hepatite associada à anemia aplástica. Esse tipo de hepatite não-A, -B, -C, -E ocorre em cerca de 28% dos pacientes que receberam transplante de fígado, sugerindo que o B19 pode, portanto, ser subdiagnosticado. Estes achados sugerem fortemente uma associação entre infecção por parvovírus B19 e o desenvolvimento de hepatites agudas, sendo, portanto, uma possível etiologia para hepatite aguda. Hepatites agudas/crônicas de causas não definidas constituem um problema

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)**Bairro:** Manguinhos**CEP:** 21.040-360**UF:** RJ**Município:** RIO DE JANEIRO**Telefone:** (21)3882-9011**Fax:** (21)2561-4815**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

na prática médica e clínica, e que mesmo com o desenvolvimento de testes laboratoriais sofisticados, uma proporção significativa das hepatites (17%) ainda permanece com causa não determinada, e apresentando aspectos que sugerem etiologia viral (hepatites não A-E).

O parvovírus B19 tem sido proposto como a causa de insuficiência hepática fulminante em pacientes com ou sem anemia aplásica, baseando-se no isolamento e caracterização do genoma do B19 em tecido hepático de pacientes com FHF, no entanto, os mecanismos de injúria hepática causada por B19 ainda não são conhecidos. O Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz apresenta linhas de pesquisa nas áreas de inovação tecnológica, desenvolvimento de métodos e uso de modelos experimentais para estudos sobre virologia, imunologia, epidemiologia molecular e patologia das hepatites de transmissão entérica A e E. A pesquisa constituiu-se em um estudo observacional analítico do tipo transversal de base populacional. Serão avaliados um total de 200 pacientes e amostras biológicas de crianças, adolescentes e jovens-adultos e adultos com quadro clínico e/ou laboratorial de hepatite aguda, crônica e/ou fulminante.

O presente estudo será realizado nos seguintes grupos populacionais: (i) 50 amostras biológicas (sangue e tecido hepático) provenientes de um banco de amostras de pacientes com hepatite fulminante, sem etiologia conhecida (hepatite não-A, B, C ou E), testadas previamente e armazenadas pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia; (ii) 100 amostras de soro provenientes de um banco de amostras de pacientes com hepatite A aguda, hepatites B ou C (agudas e/ou crônicas) armazenadas no LDTV, (iii) Serão convidados a participar do estudo 50 pacientes com quadro clínico agudo de hepatite sem etiologia conhecida (não-A, B, C e E). A partir das amostras de soro e tecido hepático serão realizados exames sorológicos e moleculares para pesquisa de anticorpos específicos contra o B19V e detecção e caracterização molecular do vírus. Este modelo de estudo permitirá a realização de análise estatística rica com análise de regressão logística e multivariada, assim como permite estudar eventuais fatores de risco e diferenças sócio-biológicas entre os pacientes. A validação dos ensaios moleculares será conduzida de acordo com instruções internacionais (Burd, 2010) e nacionais (RDC no. 27, de 17 de maio de 2012 – ANVISA). Experimentos serão conduzidos para determinar a sensibilidade analítica, especificidade analítica, precisão e acurácia da técnica.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Diagnosticar e caracterizar molecularmente a infecção pelo parvovírus humano B19 em pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes e avaliar seu papel na patogênese dessas doenças.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.896.353

**Objetivo Secundário:**

Estabelecer a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19 DNA em amostras de soro, plasma e fígado visando o diagnóstico molecular da infecção;

Avaliar as metodologias de PCR estabelecidas para a detecção e quantificação do B19 DNA no diagnóstico laboratorial utilizando amostras de soro de pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;

Determinar a prevalência de B19-DNA e anti-B19 IgM e IgG em pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;

Determinar os genótipos do B19 circulantes nos pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;

Avaliar a frequência de co-infecção pelo B19 e os vírus das hepatites A, B, e C em infecções agudas e crônicas;

Investigar o papel da infecção pelo parvovirus B19 na patogênese dos casos de falência hepática fulminante com e sem etiologia definida.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou roxidão o local, que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança.

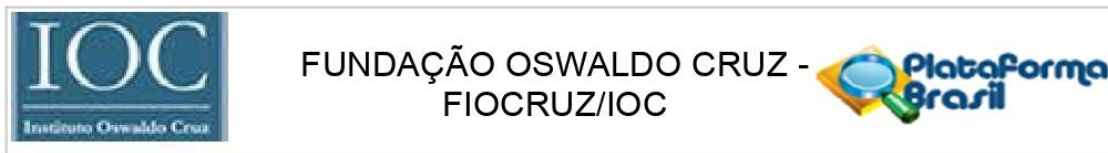
**Benefícios:**

Os pacientes receberão informações sobre os resultados da pesquisa entretanto vale ressaltar que os benefícios resultantes deste projeto aos participantes serão em termos de retorno social e acesso a futuros procedimentos laboratoriais de diagnóstico diferencial do Parvovírus B19 em casos de hepatites, uma vez que este estudo irá fornecer dados sobre o papel da infecção pelo parvovírus B19 nos casos de falência hepática fulminante com e sem etiologia definida, e com isso determinar a importância de considerar a infecção pelo B19 no diagnóstico diferencial de casos de hepatites. Além disso, o reconhecimento precoce da doença permitirá o tratamento adequado e se necessário, a transferência imediata para um centro transplantador para abordagem multidisciplinar e monitorização intensiva.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se da quarta versão deste projeto, as pendências vem sendo respondidas parcialmente como podem ser vistas no parecer consubstanciado do CEP Fiocruz/IOC de número 1.649.283,

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

datado de 26 de julho de 2016. Na carta de resposta às pendências foram incluídos comentários, justificativas e/ou modificações feitas às pendências. Nos documentos modificados foram ressaltadas as alterações feitas. Abaixo estão listadas todas as pendências e sua atual situação baseadas em carta resposta enviada pela pesquisadora em 11 de outubro de 2016:

1. A folha de rosto não está no formato da Plataforma Brasil nem especifica o patrocinador como sendo o Instituto Oswaldo Cruz.

Apresentada nova folha de rosto.

Pendência atendida

2. Projeto:

a. O desenho no formato plataforma Brasil é o Delineamento do estudo, a parte que especifica os procedimentos que serão avaliados, as unidades experimentais, a variável em análise e o modo como os procedimentos serão designados às unidades experimentais. Descrever claramente o tipo de estudo, os grupos experimentais, procedimentos e indicadores de resultado.

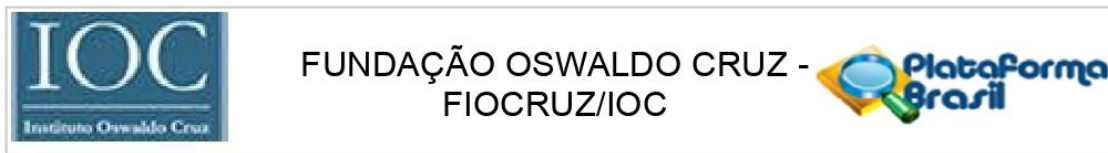
Pendência atendida

b. Na metodologia, esclarecer a população de estudo (cada um dos grupos que será avaliado) e o cálculo do tamanho da amostra de 200, se 150 pacientes serão abordados pessoalmente, recrutados ou sofrerão intervenção de 150, mas que serão divididos em 2 grupos de 50 cada, provenientes de biorrepositório (hepatites fulminantes) e de coleta de sangue (hepatites criptogênicas). Explicar o processo de seleção dos pacientes, os critérios de inclusão e exclusão, o processo de recrutamento e de entrega de resultados e tratamento caso necessário, esclarecer o grau de vulnerabilidade dos participantes e medidas protetoras propostas. Especificar o momento e forma em que serão aplicados os instrumentos de coleta de dados pelos profissionais de saúde.

Pendência atendida

c. Dos riscos e benefícios: em se tratando de pesquisas em seres humanos, considera-se que toda pesquisa apresenta riscos ao participante, ie. existe a probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Risco é a possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente. O retorno dos resultados dos exames e tratamento se necessário é direito do participante e responsabilidade do pesquisador principal,

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

portanto não é considerado benefício direto.

Pendência atendida

d. Esclarecer o local em que será aplicado e o momento de aplicação do TCLE;

Pendência atendida

e. Cronograma: Visto que o cronograma indica que a pesquisa teria início em 1/7/2015, é preciso que os pesquisadores garantam que a pesquisa não teve início. Caso tenha sido iniciada o parecer deste CEP não terá validade.

Pendência atendida em parecer anterior.

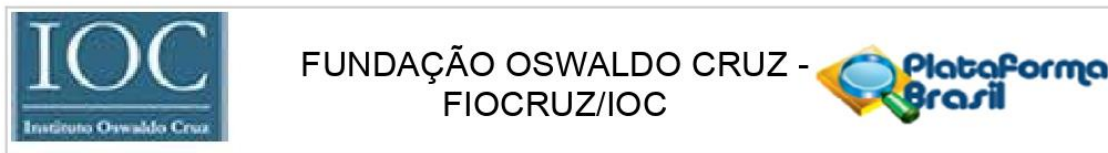
f. Apresentar orçamento como estabelecido no item 3.3 da Norma Operacional 01/2013 do CNS, detalhando os recursos, fontes e destinação; forma e valor da remuneração do pesquisador em moeda nacional; apresentar previsão de ressarcimento de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação e compensação material nos casos ressalvados no item II.10 da Resolução do CNS 466/12.

Pendências atendida em parecer anterior.

3. Os TCLEs apresentam redação em primeira pessoa, parcialmente conforme à Res. 466/12, em linguagem relativamente acessível à compreensão dos possíveis participantes da pesquisa. Apresentadas a forma e momento de aplicação do TCLE, esclarecendo que será aplicado antes da coleta das amostras e serão entregue via de igual teor ao participante. Adicionar, em linguagem adequada ao nível sócio-cultural e acessível à compreensão dos participantes da pesquisa, e preferivelmente, redigido em terceira pessoa, breve descrição do tipo de doença e opções de tratamento (explicitar qual o procedimento que será seguido caso o participante estiver infectado pelo parvovirus), as características do estudo, objetivos e justificativa, os procedimentos a serem realizados, como e por quem será realizada a coleta de amostra biológica humana e se haverá armazenamento. Além do consentimento de autorização para a coleta, deve conter consentimento

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 1.896.353

para o depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado. É necessário descrever também os prováveis riscos e desconfortos, garantias de minimização dos riscos, detalhar os benefícios diretos e indiretos prováveis, forma de acompanhamento e assistência, como serão garantidas a confidencialidade e privacidade (retirar os dados de identificação do participante) e indicar os responsáveis e encarregados pelas entrevistas e as capacitações. Ainda, deixar claro a garantia de esclarecimento constante, a voluntariedade, liberdade de desistir, que não haverá bônus financeiro pela participação, a possibilidade (ou não) de ressarcimento e indenização. Indicar a versão e data última revisão do TCLE, o endereço e telefones de contato com membros das equipes locais, incluindo a possibilidade de ligar a cobrar e que o oferecer o contato com o CEP em caso de questionamentos sobre os aspectos éticos do estudo.

#### Pendencia Atendida

Redigir o documento na forma de um convite para participação no projeto de pesquisa específico, evitando linguagem impessoal e impositiva. O TCLE redigido em primeira pessoa (no singular e plural) o que resulta em imposição e confunde. Explicar o significado dos termos técnicos de maneira a permitir o entendimento por pessoas leigas, por exemplo, o que é hepatite, qual a diferença entre hepatites agudas, crônicas e fulminantes, o que é parvovirus B19, que doenças pode causar? A estrutura do texto deve ter uma legibilidade acessível ao grau de escolaridade dos potenciais participantes da pesquisa; descrever as características básicas do projeto, em especial os objetivos e as justificativas do estudo; descrever os procedimentos de pesquisa a serem realizados durante a participação no estudo, esclarecendo a duração esperada, incluindo número de visitas, exames e procedimentos realizados, assim como o tempo destinado para realização dos exames e procedimentos, e demais informações relevantes ao participante. Oferecer o contato com o CEP somente em caso de questionamentos sobre os aspectos éticos do estudo. Em relação a "O resultado de exames laboratoriais para Parvovirus B19 serão entregues por correspondência, acompanhados de esclarecimentos sobre o significado dos resultados de maneira confidencial e o paciente será encaminhado para unidades de saúde, nos casos em que um tratamento se fizer necessário." Enviar o resultado por correspondência é impessoal e caso o resultado for positivo pode levar a preocupação para o paciente ou familiar sem ter o respaldo adequado. O resultado positivo para parvovirose deverá ser entregue diretamente ao participante para acompanhar devidamente ao paciente em consulta

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC

Continuação do Parecer: 1.896.353

no centro de recrutamento.

Pendência Atendida

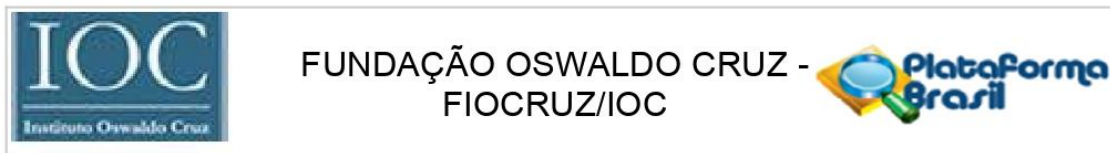
\_ Considerando que os pacientes serão recrutados através do contato com profissionais de saúde do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (LAHEP) e no Setor de Infectologia Pediátrica do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da UFF, entende-se que são estas instituições que deverão fornecer tratamento e acompanhamento aos pacientes participantes sob responsabilidade da equipe proponente do estudo, e não como escrito no TCLE, que o participante será "encaminhado (a) a um ambulatório especializado de hepatologia da rede pública para acompanhamento". Reescrever.

Pendência atendida

4. Devido à participação de crianças e/ou adolescentes, entre 5 e 18 anos, deverá ser apresentado termo de assentimento (TALE) segundo faixa etária. Embora caiba aos representantes legais dos sujeitos (familiar, tutor) ter conhecimento e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é necessária a obtenção do consentimento do próprio sujeito, mesmo se em situação de limitação de competência para decisões autônomas, portanto recomendamos seja incluído o Termo de assentimento para os menores que estejam dentro dos critérios de inclusão do estudo. Apresentados TALEs segundo faixas etárias 14 a 18 anos, 11 a 13 anos, e 7 a 10 anos, redigidos em primeira pessoa, sem local para rubrica, nem paginação, ou versão, em linguagem técnica não adequada a faixa etária.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 1.896.353

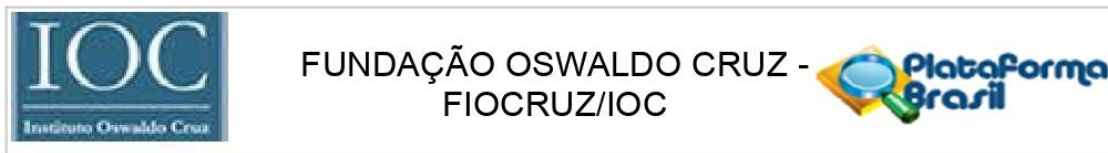
Pendência Atendida.

5. Apresentar TCLE de projeto anterior no qual pacientes "consentiram que amostras do tecido hepático (explante) fossem retiradas após o transplante do fígado, e parte do sangue que já seria coletada" para exames de rotina, "fossem utilizados para a pesquisa", no Serviço de transplante Hepático do Hospital Federal de Bonsucesso-RJ, do Hospital Estadual da Criança-RJ e Hospital da Ordem Terceira da Penitência -RJ, assim como os das amostras armazenadas no LADTV/IOC.

Pendência Atendida.

Conforme Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8, o TCLE apresentado contém consentimento de autorização para a coleta, o depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano, no entanto esta utilização é atrelada ao projeto de pesquisa específico "Avaliação dos aspectos imunopatológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante". No entanto, segundo a mesma Resolução, item 6 e Portaria MS 2.201/11, capítulo II, artigo 5 e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22, embora o TCLE informe ao participante a possibilidade de utilização futura da amostra armazenada, o uso da mesma estará condicionado obrigatoriamente, ao re consentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa (Resolução CNS 441/11). Esclarecer como será obtido o re consentimento ou justificar a isenção do mesmo.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

Pendência Atendida

6. Apresentar os instrumentos de coleta de dados. Instrumento não apresentado nem comentado na carta resposta.

Pendência Atendida.

Também ausentes termo de compromisso de Instituição co-participante "Instituto Biomédico" (UFF) e declaração da responsável Rita de Cassia Cubel Garcia, descrito em Considerações sobre termos de apresentação obrigatória em parecer anterior.

Pendencia Atendida

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Carta resposta ao CEP;  
Cartas de anuência das instituições co-participantes;  
Declarações de colaboração;  
TCLE responsável  
Termos de Assentimento.

**Recomendações:**

Qualquer modificação ou emenda ao projeto deverá ser submetida à apreciação do CEP FIOCRUZ/IOC. Deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final.

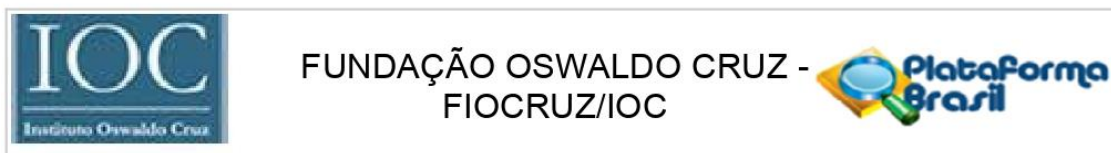
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 223ª Reunião Ordinária, realizada em 17.01.2017, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



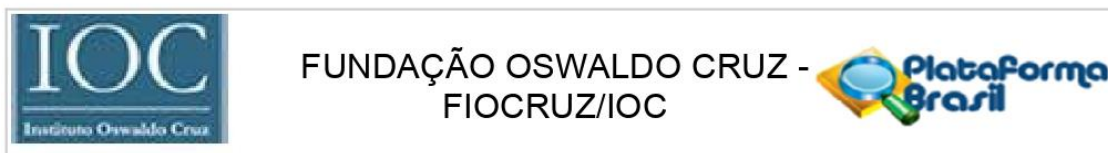
Continuação do Parecer: 1.896.353

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_535117.pdf	11/10/2016 11:58:52		Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg04.pdf	11/10/2016 11:57:06	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg03.pdf	11/10/2016 11:56:19	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg02.pdf	11/10/2016 11:55:38	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg01.jpg	11/10/2016 11:54:51	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_14_18_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:59	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_11_13_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:35	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_7_10_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:20	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_B19_04out16.doc	11/10/2016 11:33:59	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_anuencia_Rita_UFF.jpg	11/10/2016 11:33:24	Luciane Almeida Amado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_B19_FHF_04out16.doc	11/10/2016 11:28:26	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_intituicao_Pesquisa_Rita_Cubel_UFF.pdf	13/06/2016 16:28:21	Luciane Almeida Amado	Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE FHF.pdf	10/08/2015 11:51:35		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto_assinada.pdf	10/08/2015 11:48:22		Aceito
Outros	termo compromisso e confidencialidade.pdf	12/06/2015 12:27:04		Aceito
Parecer Anterior	Parecer CEP Fiocruz_Hepatite fulminante.pdf	12/06/2015 11:16:18		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia_Marcelo.pdf	12/06/2015 11:07:34		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia_Claudete.pdf	12/06/2015 11:07:17		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia Elisabeth.pdf	12/06/2015 11:06:59		Aceito
Outros	Carta autorização HUAP_Projeto_Parvovirus_FIOCRUZ_09062015.pdf	12/06/2015 11:06:43		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 23 de Janeiro de 2017

---

**Assinado por:**  
**José Henrique da Silva Pilotto**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

## **8.2 Comitê de Ética em Pesquisa para os artigos 4 e 5**

**Título:** Avaliação da prevalência, incidência e aspectos imunopatológicos da infecção por Parvovirus B19 em diferentes grupos de risco

**CAAE:** 16918919.7.0000.5248

**Parecer aprovando o projeto:** 3.627.364



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA, INCIDÊNCIA E ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR PARVOVIRUS B19 EM DIFERENTES GRUPOS DE RISCO**Pesquisador:** Luciane Almeida Amado**Área Temática:****Versão:** 2**CAAE:** 16918919.7.0000.5248**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 3.627.364**Apresentação do Projeto:**

Versão 2

Trata-se de 2ª versão de projeto que propõe um estudo analítico observacional do tipo transversal a amostragem será de conveniência. Serão recrutados pacientes com alterações hematológicas, pacientes com algum grau de imunocomprometimento e pacientes com quadros febris agudos, atendidas no INI. Recrutamento de 100 pacientes por ano (sendo 20 com alterações hematológicas, 30 com algum grau de imunocomprometimento e 50 com quadros febris

agudos). Esses participantes serão submetidos a:

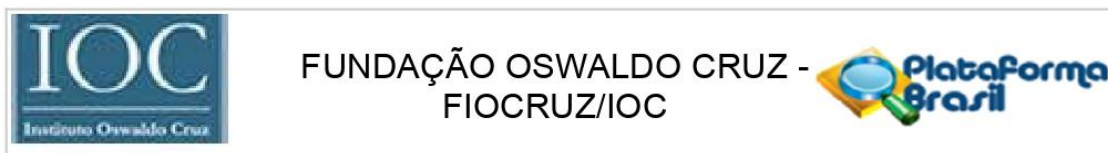
-amostras de sangue e tecido (quando disponível) para diagnóstico de rotina da unidade participante do estudo.

-entrevista (participantes ou seus responsáveis).

O recrutamento “ocorrerá após a realização da consulta, em uma sala reservada, por meio de abordagem pessoal através de profissionais de saúde da instituição. Será apresentado ao participante o TCLE ou o TALE (quando houver a participação de crianças e/ou adolescentes)...” e será aplicado o questionário em anexo.

As amostras serão armazenadas em biorepositórios do laboratório (LADTV), durante o período de vigência do estudo.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)**Bairro:** Manguinhos**CEP:** 21.040-360**UF:** RJ**Município:** RIO DE JANEIRO**Telefone:** (21)3882-9011**Fax:** (21)2561-4815**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.627.364

No estudo analítico coorte prospectivo, os participantes identificados com infecção pelo Parvovírus B19, será realizado um estudo para seguimento por seis meses, para avaliar o curso da infecção e prognóstico da doença.

Os pacientes serão recrutados por contato telefônico para participar de consultas agendadas no INI (1,3 e 6 meses após o diagnóstico laboratorial da infecção).

Serão submetidos a novas coletas do sangue ou tecido (quando disponível)."

Tamanho da amostra: 300

**Objetivo da Pesquisa:**

"Objetivo Primário:

Investigar a infecção causada pelo Parvovírus humano B19 em participantes com alterações hematológicas (imunocomprometidos e imunocompetentes) e em participantes com doença febril aguda, acompanhando os aspectos clínicos e imunopatológicos dessa infecção nesses participantes."

'Objetivos Secundários:

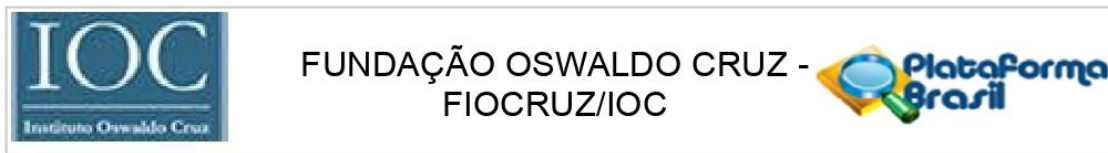
- Caracterizar o perfil demográfico e clínico dos participantes com infecção por B19V;
- Realizar o diagnóstico sorológico da infecção por B19, estimando a prevalência e incidência nestas populações;
- Detectar e quantificar o B19V por PCR em tempo real;
- Acompanhar o curso da infecção pelo B19V em participantes durante e após a infecção aguda e avaliar a ocorrência de infecção persistente;
- Avaliar a persistência do B19V DNA correlacionando ao desenvolvimento e prognóstico de doenças;
- Avaliar fatores de risco associados a infecção causada por B19V nos participantes;
- Caracterizar o(s) genótipo(s) de B19V circulante(s) no Rio de Janeiro."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Foram mencionados riscos de desconforto relacionados a coleta de sangue e riscos psicológicos relacionados a constrangimento e quebra de sigilo. O pesquisador mencionou formas de minimização dos mesmos.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.627.364

**Benefícios:**

Foram relatados benefícios indiretos com a pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa em conformidade com a Resolução 466/12 e outras normas operacionais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram avaliados os seguintes documentos:

1) Carta\_de\_resposta - Documento em formato PDF, em papel timbrado e em 3 páginas.

Carta resposta, ponto a ponto, ao parecer número 3.521.408. Documento assinado pela responsável pelo projeto Dra. Luciane A. Amado Leon em 23 de setembro de 2019.

2) PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1377004 - Formulário formato Plataforma Brasil.

3) Projeto - Projeto na íntegra. Documento composto de 15 páginas, em papel timbrado e assinado por todos os membros da equipe.

4) Regimento\_Biorrepositorio - Regimento de Biorrepositório do LADTV. Documento no formato PDF, assinado pela responsável pelo projeto e pela guarda do Biorrepositório, Dra. Luciane A. Amado Leon; pela chefe do laboratório Dr<sup>a</sup> Jaqueline M. de Oliveira e pelo diretor do IOC, Dr. José Paulo G. Leite. Documento datado em 20/09/2019.

5) TALE\_4a7, TALE\_8a12 e TALE\_13a17 - TALE para participantes menores. Documentos no formato PDF, papel timbrado e em 2 páginas.

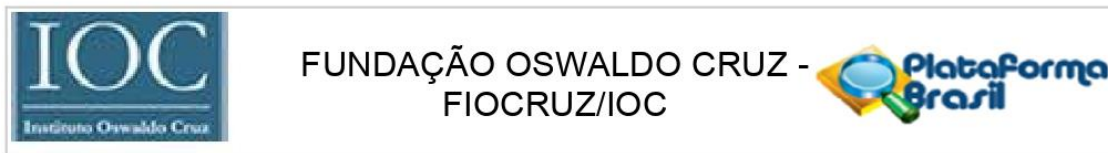
6) TCLE - TCLE para participantes maiores. Documento em formato PDF, papel timbrado e em 2 páginas.

7) TCLE\_responsavel - TCLE para responsáveis de menores de idade e incapazes. Documento em formato PDF, papel timbrado e em 2 páginas.

**Recomendações:**

O recrutamento dos participantes do INI estava previsto para 20/09/2019, data anterior a

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.627.364

liberação do CEP. Ajustar o cronograma em função da data de liberação desta licença.

O recrutamento de participantes somente deverá ocorrer após aprovação do projeto pelo CEP.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências, abaixo relacionadas, apontadas no Parecer Nº 3.521.408 de 21 de agosto de 2019 foram atendidas

1) PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1377004 e 2) Projeto completo (detalhado) - Nos dois documentos são necessários as seguintes adequações:

a) Explicitar o tempo de duração do estudo; PENDÊNCIA ATENDIDA

b) Rever o texto relacionado aos riscos. É necessário considerar, além dos riscos físicos, os psicológicos e outros como quebra de sigilo e confidencialidade durante a pesquisa. Além disso, formas de minimização dos mesmos devem ser relatadas. Sempre há a possibilidade de ocorrência de situações inesperadas, além das mencionadas, que podem colocar uma pessoa ou todo o grupo em risco físico e/ou de constrangimento; PENDÊNCIA ATENDIDA

c) Como o estudo inclui a participação de crianças, adolescentes e, provavelmente, portadores de deficiências (deve constar no texto) com diminuição de capacidade de consentimento, deve ser especificar no protocolo que esses participantes somente serão incluídos após assinatura do consentimento do representante legal e assinatura do termo de assentimento. PENDÊNCIA ATENDIDA

3) TCLE –

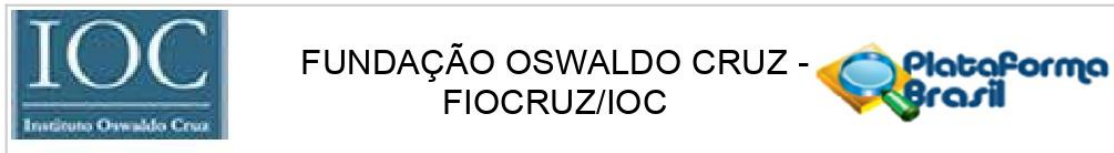
a) As páginas devem ser numeradas indicando nº total de páginas do documento (Ex: 1 de 2; 2 de 2), garantindo assim a integridade das informações contidas no documento. PENDÊNCIA ATENDIDA

b) Rescrever o trecho do texto relacionado aos riscos.

A resolução 466/12 define: "risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente;" Sendo assim, outros riscos, além dos físicos, mesmo que improváveis devem ser considerados e formas de minimização dos mesmos devem ser oferecidas. Sempre haverá a possibilidade de ocorrência de situações inesperadas – além das mencionadas pelo pesquisador-

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 3.627.364

que podem colocar uma pessoa ou todo o grupo em risco físico e/ou de constrangimento. Devem ser oferecidas forma de acompanhamento e assistência, caso necessário. PENDÊNCIA ATENDIDA

c) Mencionar no Termo a aplicação do questionário. O questionário epidemiológico e um instrumento de coleta de dados que fará parte do estudo em questão, sendo assim deverá ser detalhado no termo. Deverá ser mencionado além do local e momento de aplicação, quando e quem o aplicará, de forma a garantir a confidencialidade do participante da pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA

d) O termo deve mencionar a não oferta de dinheiro para a participante da pesquisa, entretanto, é necessário que fique claro que caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, o mesmo de poderá buscar indenização obedecendo as disposições legais vigentes no Brasil. Acrescentar a informação no corpo do texto. Os TCLEs são documentos válidos à apreciação jurídica e, como tal, devem resguardar participantes e pesquisadores. PENDÊNCIA ATENDIDA

e) Além do consentimento de autorização para a coleta de sangue e aplicação de questionário, o Termo deve conter consentimento para o depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado. PENDÊNCIA ATENDIDA

4) TALEs (4 a 7 anos; 8 a 12 anos e 13 a 17 anos) -

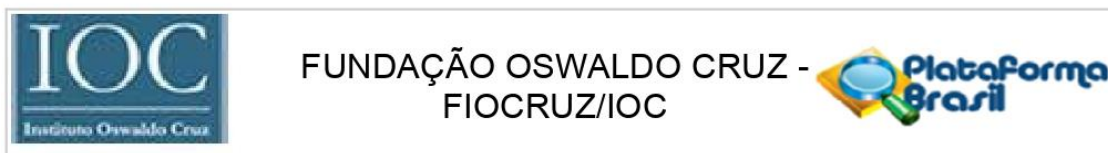
O TALE NÃO PODE SER UMA CÓPIA DO TCLE OU DO PROJETO.

A Resolução 466/12 define; "Termo de Assentimento - documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou para os legalmente incapazes, por meio do qual, após os participantes da pesquisa serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais;" Sendo assim, o Termo deve conter as informações do TCLE de forma simplificada adaptada, acessível a cada faixa etária. O texto não pode omitir as informações necessárias. Devem ser evitados termos técnicos ou quaisquer outras palavras que possam gerar incompreensões por parte das crianças, adolescentes ou incapazes. O TALE pode ser elaborado com textos lúdicos, para facilitar a compreensão das crianças das menores faixas etárias. Veja o exemplo abaixo:

<http://www.scielo.br/pdf/tce/v26n3/0104-0707-tce-26-03-e2460016.pdf>

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 3.627.364

Existem alguns modelos de TALE disponíveis, que poderão ser adaptados ao seu estudo.

<https://ligacontraocancer.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Termo-de-Assentimento-Livre-e-Esclarecido-TALE.pdf> . PENDÊNCIA ATENDIDA

5) Incluir TCLE para o responsável do menor ou incapaz.

O TALE não elimina a necessidade de apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o responsável ou representante legal do menor de 18 anos ou legalmente incapaz. Seguir todas as orientações relacionadas ao TCLE para participantes. PENDÊNCIA ATENDIDA

6) Anexar o regimento de Biorrepositório de acordo com a resolução 441/11.

PENDÊNCIA ATENDIDA

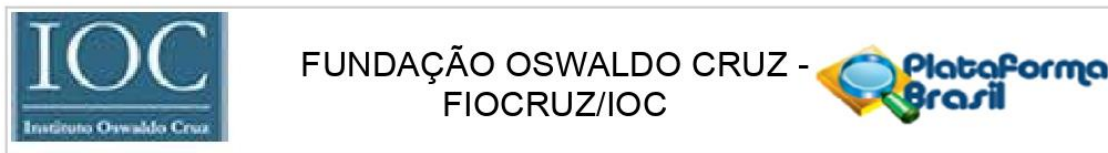
#### Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) em sua 256ª reunião, realizada em 08.10.2019, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa supracitado.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1377004.pdf	23/09/2019 11:41:49		Aceito
Outros	Carta_de_resposta.pdf	23/09/2019 11:41:22	Luciane Almeida Amado	Aceito
Parecer Anterior	3521408_Parecer_CEP.pdf	20/09/2019 11:04:54	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Regimento_Biorrepositorio.pdf	20/09/2019 11:03:43	Luciane Almeida Amado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	20/09/2019 11:03:06	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TALE_13a17.pdf	20/09/2019 11:02:48	Luciane Almeida Amado	Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.627.364

Ausência	TALE_13a17.pdf	20/09/2019 11:02:48	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_8a12.pdf	20/09/2019 11:02:37	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_4a7.pdf	20/09/2019 11:02:28	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsavel.pdf	20/09/2019 11:02:14	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/09/2019 11:00:29	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Questionario.pdf	07/07/2019 17:52:38	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	07/07/2019 17:51:58	Luciane Almeida Amado	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	07/07/2019 17:49:25	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesquisadores.pdf	07/07/2019 17:49:01	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_LADTV.pdf	07/07/2019 17:48:35	Luciane Almeida Amado	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/07/2019 17:48:22	Luciane Almeida Amado	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/07/2019 17:47:08	Luciane Almeida Amado	Aceito

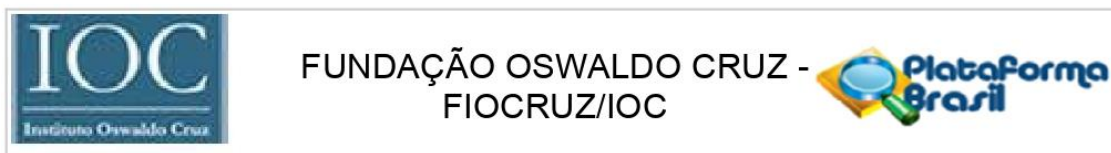
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.627.364

RIO DE JANEIRO, 08 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**  
**José Henrique da Silva Pilotto**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

### **8.3 Comitê de Ética em Pesquisa para o artigo 5**

**Título:** Detecção e caracterização molecular de Citomegalovírus, Herpesvírus humano 6, Parvovírus humano B19 e Vírus Epstein-barr em crianças e adolescentes com doenças exantemáticas

**CAAE:** 80635017.4.1001.5248

**Parecer aprovando o projeto:** 2.498.339

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CITOMEGALOVÍRUS, HERPESVÍRUS HUMANO 6, PARVOVÍRUS HUMANO B19 E VÍRUS EPSTEIN-BARR EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇAS EXANTEMÁTICAS

**Pesquisador:** Luciane Almeida Amado

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 80635017.4.1001.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.498.339

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo de corte transversal cuja amostra será obtida por conveniência. Apesar da maioria das doenças exantemáticas serem benignas e autolimitadas, algumas representam um risco importante para certos grupos etários e situações clínicas específicas como gravidez e imunossupressão, uma vez que podem evoluir com curso clínico mais grave. Por isso, é de grande importância averiguar o diagnóstico etiológico que pode estar implicado com as doenças exantemáticas virais, a fim de garantir um tratamento adequado e estabelecer as medidas necessárias para o controle da doença. Deste modo, o objetivo do trabalho é avaliar a prevalência das doenças exantemáticas virais em amostras de conveniência de crianças e adolescentes atendidos no Hospital Getúlio Vargas Filho e no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense, ambos em Niterói.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a infecção causada por Citomegalovírus humano, Herpesvírus Humano 6, Parvovírus humano B19 e Vírus Epstein-Barr em crianças e adolescentes com doença exantemática.

**Objetivos Secundários:**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC

Continuação do Parecer: 2.498.339

- 1- Caracterizar o perfil demográfico e clínico dos pacientes pediátricos com doenças exantemáticas;
- 2- Realizar o diagnóstico sorológico dessas infecções e estimar a prevalência destas infecções nesta população;
- 3- Detectar e quantificar o HCMV, HHV-6, B19V e EBV por PCR em tempo real;
- 4- Acompanhar o curso da infecção pelo B19V em pacientes durante e após a infecção aguda e avaliar a ocorrência de infecção persistente;
- 5- Avaliar a persistência do B19 DNA em tecidos não-eritróides e correlacionar ao desenvolvimento de doenças atípicas;
- 6- Avaliar fatores de risco associados com a infecção causada por HCMV, HHV-6, B19V e EBV nos pacientes;
- 7- Caracterizar o(s) genótipo(s) de HCMV, HHV-6, B19V e EBV circulante(s) no Rio de Janeiro.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:****Riscos:**

Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou roxidão no local, que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança por profissionais experientes na coleta de sangue de crianças.

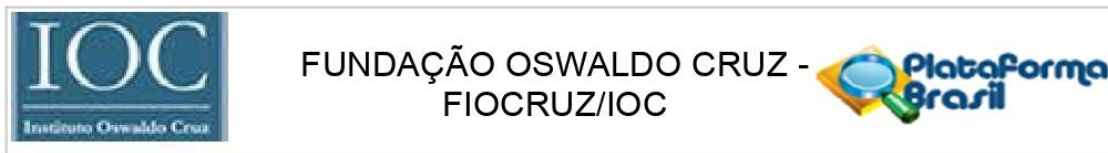
**Benefícios:**

Os pacientes serão informados sobre os resultados do diagnóstico da infecção, os quais não são rotineiramente realizados nos serviços de saúde. Os benefícios resultantes deste projeto aos participantes serão em termos de retorno social e acesso a futuros procedimentos laboratoriais de diagnóstico diferencial do Citomegalovírus, Herpesvírus humano 6, Parvovírus humano B19 e Vírus Epstein-Barr, uma vez que este estudo irá fornecer dados sobre a prevalência desses vírus nos casos de doença exantemática sem etiologia definida.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As doenças exantemáticas virais constituem um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de procura por atendimento médico em consultórios pediátricos e nos serviços de emergência. Assim, torna-se relevante o estudo, para detectar o diagnóstico diferencial exato das doenças exantemáticas, para fins epidemiológicos, e para o controle e sua erradicação.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.498.339

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

- 1- Folha de rosto: assinada pelo pesquisador e pela instituição proponente.
- 2- Orçamento: financiamento IOC/Fiocruz
- 3- Cartas de anuência: ok
- 4- TALEs: atendida exigência conforme descrita abaixo.
- 5- Cronograma: Atualizar

**Recomendações:**

Atualizar cronograma com relação à coleta de dados.

O projeto deverá ser desenvolvido na forma em que foi aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está em conformidade com a Resolução 466/12 do CNS, após a pesquisadora ter atendido as pendências em carta resposta ao CEP tais como:

- 1- Mudanças nos TALEs de acordo com a faixa etária : 4-7; 8-12; 13-18.
- 2- Acrescenta nos TALEs um parágrafo sobre o ressarcimento das despesas com transporte e alimentação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/2012, manifesta-se por APROVAR o projeto em tela após a deliberação do Comitê na 235ª Reunião Ordinária, comunicando que:

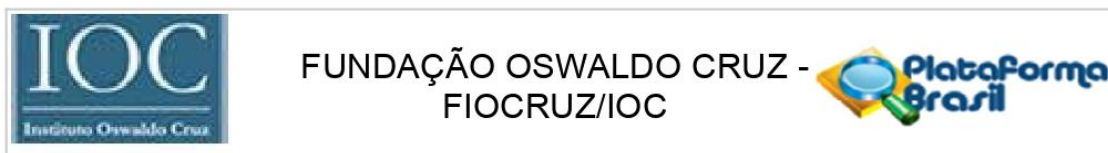
Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.498.339

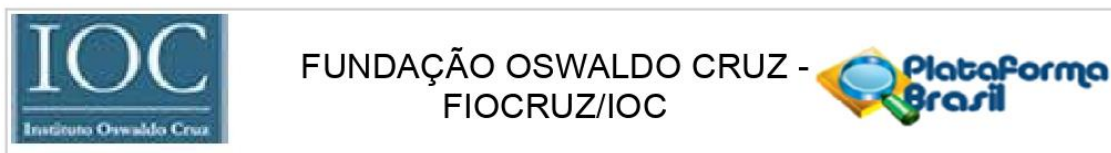
Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Cabe ressaltar que a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1001090.pdf	22/12/2017 10:43:29		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_22dez17.pdf	22/12/2017 10:42:34	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_13_18_anos_V3.doc	22/12/2017 10:25:55	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_8_12_anos_V3.doc	22/12/2017 10:25:04	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_4_7_anos_V3.doc	22/12/2017 10:24:46	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_22dez17.doc	22/12/2017 10:24:15	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_UPC.pdf	01/12/2017 16:28:31	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_14_18_anos.doc	01/12/2017 16:27:39	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_11_13_anos.doc	01/12/2017 16:27:24	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TALE_7_10_anos.doc	01/12/2017 16:27:10	Luciane Almeida Amado	Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.498.339

Ausência	TALE_7_10_anos.doc	01/12/2017 16:27:10	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_01dez17.doc	01/12/2017 16:26:33	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Carta_anuencia_HGVFo.pdf	01/12/2017 09:17:49	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_UFF.pdf	01/12/2017 09:16:21	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	Projeto_CEP_doencas_exantematicas_Questionario_24082017.doc	01/12/2017 09:15:03	Luciane Almeida Amado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_doencas_exantematicas_20set17.doc	01/12/2017 09:11:32	Luciane Almeida Amado	Aceito
Orçamento	Orcamento_061117.pdf	01/12/2017 09:10:10	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores_01DEZ17.pdf	01/12/2017 09:08:42	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Projeto_CEP_doencas_exantematicas_Biorrepositorio_ASSINADO_2.pdf	01/12/2017 09:08:20	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_instituicao_infraestrutura.pdf	01/12/2017 09:06:01	Luciane Almeida Amado	Aceito
Cronograma	Cronograma_061117.pdf	01/12/2017 09:04:41	Luciane Almeida Amado	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_06nov17.pdf	01/12/2017 08:58:54	Luciane Almeida Amado	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 18 de Fevereiro de 2018

Assinado por:  
**Maria Regina Reis Amendoeira**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br