



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة



التحري المناعي عن بعض الفايروسات عند مرضى التلاسيميا ودراسة جزيئية لفايروس البارفو B19 في محافظة ديالى

رسالة مقدمة الى مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل
علاء رعد رحيم
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى
2020

بإشراف
د. أنسام داود سلمان
الاستاذ المساعد



Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Department of Biology



Serological detection of some viruses among thalassemia patients and molecular study of Parvovirus B19 in Diyala province

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science, University of Diyala, in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master in Biology

By

Ola Raad Raheem

B.Sc. Biology /College of Science / Diyala University,
2020

Supervised by

Dr. Ansam Dawod Salman

Assistant Professor

2024 A.D

1446 A.H

Chapter One

Introduction

1.1. Introduction:

Parvovirus B19 (B19V) is a virus characterized by its small size and lack of an envelope. Its dimensions range from approximately 23 to 26 nm. The virus possesses a linear single-stranded DNA genome of 5.6 kilobases, which is flanked by two similar terminal helical formations (Qiu *et al.*, 2017; Luo and Qiu, 2015). According to Cotmore *et al.* (2014), B19V is classified within the Erythroparvovirus genus of the Parvoviridae family. Jalali *et al.* (2022) state that its genome is responsible for the transcription of nine primary viral messenger RNAs (mRNAs)(Yetgin and Elmas, 2010).

The transmission of Parvovirus strain occurs by various routes, including contaminated secretions from lungs, close interactions, transplacental transmission, blood donation, and even transplantation of organs. The virus disease can manifest in immunodeficient individuals, particularly those who received kidney transplants, due to the stimulation of the indigenous silent virus or the presence of chronic viremia (Marano *et al.*, 2015; Thongprayoon *et al.*, 2022).

The occurrence of purely red blood cell growth, a potentially fatal consequence, has been documented in individuals with compromised immune systems, such as those who have undergone hematopoietic stem cell transplants or solid organ transplants (Chen *et al.*, 2010; Ganaie and Qiu, 2018). According to Nasir *et al.* (2014) and Janovitz *et al.* (2017), the interaction with P antigenic serves as a principal surface cell interface for human erythrocyte precursors and vascular cells within the context of B19V disease(Leisi *et al.*, 2015;Simpson *et al.*, 2016; Kishore and Kishore, 2018).

Three additional scientific backing relationships of B19V include B19V-stimulated natural megakaryocytic thrombocytopenia in infants, myositis as a

complication of erythema infectiosum in children, and non-acute gangrene of the gastrointestinal tract with deep inflammation of both the bladder and the jejunum to upper colon tract, with a mortality rate of 50% (Kishore *et al.*, 2010; Kishore and Kishore, 2018). Congenital infection can result in various outcomes, including an absence of symptoms in both mother and fetus, temporary embryonic anemia and non-immune hydrops fetalis, as well as infertility and fetal mortality during pregnancy. Bonvicini *et al.* (2011) revealed the occurrence of fetal complications, including congenital heart disease, endothelial lesions, and particularly fetal brain impairments.

The occurrence of anti-B19V IgG varies between 15% and 60% among youngsters and between 30% and 60% among adults. Furthermore, it exceeds 85% in the geriatric population. The expected susceptibility to B19V infections among pregnant women ranges from 26% to 43.5%, while the recurrence frequency is between 0.61% and 2.4%. During pandemics, there is a potential for a rise in frequency amounting to 13.5% (Crane *et al.*, 2008; Megli *et al.*, 2022).

According to Hussein *et al.* (2021a, 2021b), the prevalence of anti-B19V IgM positivity was 45.0% among children diagnosed with erythema infectiosum, 34.8% in children with thalassemia, and 3.3% in healthy children. The study found that the prevalence of anti-B19V IgM in pregnant women was 3.3%, but the prevalence of IgG was 74.7%. Women in their third month of pregnancy and mothers with 1-3 previous deliveries exhibited higher levels of IgG. According to Hasan *et al.* (2013), there was a notable correlation between IgM levels and variables such as age and the total number of previous pregnancies (Almada *et al.*, 2022).

Although there are differences in the genes, it is believed that these three B19V genotypes share similar biological characteristics, ability to cause disease,

and methods of transmission. As a result, they present comparable detection difficulties in a medical environment (Jain and Kant, 2018; Garcia *et al.*, 2017; Seetha *et al.*, 2021).

The relationship among B19 genetic variants when infecting individuals with bleeding disorders remains uncertain due to the absence of illness-specific varieties. Furthermore, investigations have revealed the presence of the three genetic variants in both symptomatic and asymptomatic patients across many different nations worldwide (Jain and Kant, 2018; Seetha *et al.*, 2021).

In Iraq, 34% of thalassemia patients were positive for anti-B19V IgM (Hussein *et al.*, 2021). In India, anti-B19 IgG was found in 81% of thalassemia patients, while anti-B19 IgM was present in 41.1%. The mean age of these patients was 8 years, and the seropositivity increased with the number of transfusions. Among Iranian patients with major thalassemia, 4% had detectable B19 DNA, with the dominance of genotype 1 (Arabzadeh *et al.*, 2017).

1.2. Objectives of the study:

After conducting scientific examinations, it was found that there is a lack of prior research on the detection and genotypes of B19 in individuals with thalassemia. Consequently, the present study was proposed with the aim established by:

1. To conduct immunological and molecular detection of Parvovirus B19 among thalassemia patients in Diyala, Iraq.
2. To explore the impact of socio-demographic factors including age, gender, residence, educational attainment, number of blood transfusions, and HBV, HCV, and HIV infections.

الخلاصة

الـ B19 هو عضو في عائلة الفايروسات الصغيره و B19 يسبب العديد من الأمراض السريرية بما في ذلك الحمامية المعدية والمفاصل والاستسقاء الجنيني أو فقر الدم الانحلالي المزمن مثل متلازمة التلاسيميا والأزمات اللاتسجية العابرة. فايروس B19 يمكن أن ينتقل عن طريق إفرازات الجهاز التنفسي ومنتجات الدم وعمليات نقل الدم. الكشف المصلي والجزيئي لفيروس Parvovirus B19 بين مرضى التلاسيميا في محافظة ديالى، العراق واستكشاف تأثير العوامل الاجتماعية والديموغرافية بما في ذلك العمر والجنس ونوع التلاسيميا ومدة التلاسيميا (سنوات) ومؤشرات الدم (إجمالي عدد كريات الدم البيضاء والخلايا الليمفاوية والخلايا الحبيبية والهيموغلوبين وكرات الدم الحمراء وعدد الصفائح الدموية). شملت هذه الدراسة مائة وثمانين مشاركاً. وكانت الفئة العمرية بين (1-60) سنة. تم تقسيم مجتمع الدراسة إلى مجموعتين: الأولى تضم 90 مريضاً مصاباً بمرض التلاسيميا المؤكد مختبرياً و الثانيه تضم 90 فرداً أصحاء.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن المعدل الإيجابي الإجمالي للجسام المضادة لـ Parvo B19 IgM و HBs Ag و HCV Ab و HIV Ab كان 28(31.1%) و 3(3.3%) و 2(2.2) و 0(0.0). على التوالي بين مرضى التلاسيميا. بينما كانت معدلات الكشف بين أفراد المجموعة الثانية الافراد الاصحاء هي 2(2.2)، 2(2.2)، 1(1.1) و 0(0.0) على التوالي بالنسبة لعلامات Anti-Parvo B19 IgM و HBs Ag و HCV Ab و HIV Ab. ومن ناحية أخرى، تم تطبيق التقنية الجزيئية RT-PCR على 45 عينة بلازما، 25 منها تعود لمرضى التلاسيميا الذين تم اختيارهم على أنهم لديهم مستوى عالي من مضاد B19 IgM أما العينات البلازما العشرين المتبقية فكانت لأفراد مجموعته السيطره. من بين هؤلاء 1(4.0%) فقط من المرضى كان لديه الحمض النووي الفيروسي الدنا لفيروس B19، في حين كانت العينات الـ 24 المتبقية (96.0%) سلبية. على الجانب الآخر، كانت جميع عينات السيطرة سلبية للحمض النووي لفيروس البارفو B19. ولذلك لا يمكن إجراء أي تحليلات إحصائية.

كانت إيجابية الأجسام المضادة لـ Parvo B19 IgM أعلى بين (5-8) سنوات من العمر (50%) و 1(10.0) في مرضى التلاسيميا والأفراد المسيطرين على التوالي. في حين أنها كانت أعلى بشكل غير معنوي بين الذكور مقارنة بالإناث (34.0، 2.4 مقابل 27.0، 2.1%) في كل من مرضى التلاسيميا والأفراد السيطره. علاوة على ذلك، كان معدل إيجابية مضاد B19 IgM أعلى بشكل ملحوظ بين التلاسيميا الكبرى 26 مقارنة بالتلاسيميا الصغرى 2(30.6% مقابل 40%، $P = 0.659$). بالإضافة إلى ذلك، أظهرت النتائج أيضاً أن معدل إيجابية المضاد B19 IgM انخفض مع زيادة مدة الإصابة بالتلاسيميا.

وجدت نتائج ارتباط الأجسام المضادة لـ Parvo B19 IgM مع علامات فيروسية أخرى أن 2(66.7%) من المشاركين الإيجابيين لـ Parvo B19 IgM كانوا إيجابيين أيضاً لـ HBs Ag. علاوة على

ذلك، كان 1 (33.3) من المشاركين السلبيين المضادين لـ Parvo B19 IgM إيجابيين بالنسبة لـ HBs Ag و 61 (70.1) كانوا سلبيين لكل من IgM المضاد لـ Parvo B19 و HBs Ag مع فروق ذات دلالة إحصائية. أظهرت النتائج أن 0.0% من الأجسام المضادة لـ Parvo B19 IgM كانت إيجابية أيضًا لفيروس HCV Ab في كل من مرضى التلاسيميا والأفراد المسيطرين. أخيرًا، وجدت النتائج أيضًا أن جميع المشاركين (100%) الذين كانت نتيجة فحصهم إيجابية لمضاد Parvo B19 IgM كانت نتائجهم سلبية لفيروس نقص المناعة البشرية HIVAb.

أظهرت النتائج أن مريض واحد فقط (4.0%) كان إيجابيًا للحمض النووي الدنا لفيروس Parvovirus B19 بينما كان 24 مريضًا متبقون (96.0%) سلبيين. وكانت جميع عينات المراقبة سلبية بالنسبة للحمض النووي الدنا لل Parvovirus B19.

أثبتت نتائج ارتباط مضاد B19 IgM مع قياس مؤشرات الدم (إجمالي عدد كريات الدم البيضاء والخلايا الليمفاوية والخلايا الحبيبية والهيموغلوبين وعدد كرات الدم الحمراء والصفائح الدموية) أن متوسط الانحراف المعياري لإجمالي عدد كريات الدم البيضاء، وإجمالي عدد الخلايا الليمفاوية، وإجمالي عدد الخلايا الحبيبية وتركيز الهيموغلوبين وإجمالي عدد كرات الدم الحمراء وعدد الصفائح الدموية في مرضى التلاسيميا الذين ثبتت إصابتهم بمضاد البارفو B19 IgM 13.93 ± 13.08 خلية / ملم مكعب، 9.24 ± 12.01 خلية / ملم مكعب، 2.46 ± 4.69 خلية / ملم مكعب، 1.30 ± 7.59 جرام/ديسيلتر، 0.54 ± 2.79 جسيم/متر مكعب. مم و 284.8 ± 469.4 صفيحة / مم مكعب على التوالي. في حين أن متوسط الانحراف المعياري لإجمالي عدد خلايا الدم البيضاء، وإجمالي عدد الخلايا الليمفاوية، وإجمالي عدد الخلايا الحبيبية، وتركيز الهيموغلوبين، كان إجمالي عدد كرات الدم الحمراء والصفائح الدموية في مرضى التلاسيميا الذين كانت نتائجهم سلبية لمضاد البارفو B19 IgM 14.51 ± 11.94 خلية / ملم مكعب، 8.96 ± 8.34 خلية / ملم مكعب، 4.76 ± 6.17 خلية / ملم مكعب، 1.32 ± 7.82 جرام / ديسيلتر، 0.49 ± 2.87 جسيم / ملم مكعب. ملم و 252.6 ± 474.1 صفيحة / مم مكعب على التوالي. في المجموعة الضابطة، كان متوسط الانحراف المعياري لإجمالي عدد كرات الدم البيضاء، وإجمالي عدد الخلايا الليمفاوية، وإجمالي عدد الخلايا الحبيبية، وتركيز الهيموغلوبين، وإجمالي عدد كرات الدم الحمراء وعدد الصفائح الدموية في هؤلاء الأفراد الذين كانت نتائجهم إيجابية لمضاد البارفو B19 IgM 2.02 ± 5.44 خلية / ملم مكعب، 2.19 ± 1.10 خلية / ملم مكعب، 3.25 ± 0.92 خلية / ملم مكعب، 13.55 ± 3.32 جم / ديسيلتر، 0.11 ± 3.83 جسيم / ملم مكعب و 35.4 ± 255.0 صفيحة / ملم مكعب على التوالي. بينما كان متوسط الانحراف القياسي لدى الأفراد الذين كانت نتائجهم سلبية لمضاد البارفو B19 IgM 1.11 ± 5.68 خلية/مكعب، 0.87 ± 3.58 خلية/مكعب، 1.32 ± 13.13 جم/ديسيلتر، 0.37 ± 4.09 جسيم / ملم مكعب و 51.0 ± 222.2 الصفائح الدموية / ملم مكعب على التوالي.