

INFECCIÓN POR PARVOVIRUS B19

Ana María García Tapia, María del Carmen Lozano Domínguez y Clotilde Fernández Gutiérrez del Álamo.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz

El parvovirus B19 (B19) fue descubierto casualmente en 1974 por Cossart cuando realizaba ensayos de virus de la hepatitis B en sueros de donantes sanos. Su nombre se debe a la muestra de suero (19 del panel B) que resultó positiva por contrainmunolectroforesis y negativa por otras técnicas. La observación del precipitado mediante microscopía electrónica reveló la presencia de unas partículas víricas de 23 nm. En 1981, Pattison lo asoció por primera vez a una enfermedad concreta, la crisis de anemia aplásica transitoria (CAT), al encontrar antígeno B19 o anticuerpos IgM en sueros de pacientes con anemia de células falciformes. En 1985, y tras realizar la inoculación experimental del virus en voluntarios sanos, Anderson demostró que es el agente etiológico del eritema infeccioso (EI), megaloeritema epidémico o “quinta enfermedad”.

En la actualidad, el espectro de cuadros clínicos en los que se implica al B19 se ha ampliado, e incluye: producción de abortos o hidropesía fetal no inmune, artritis, anemia crónica en inmunodeprimidos, eritroblastopenia transitoria de la infancia, púrpura vascular, púrpura trombocitopénica, hemofagocitosis, encefalitis, miocarditis, costocondritis, linfadenitis mesentérica, gastroenteritis aguda, pseudoapendicitis, vasculitis aguda, poliarteritis nudosa, queratolisis exfoliativa, bronquitis, bronquiolitis, laringitis, síndrome de distrés respiratorio y otros.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El B19 pertenece a la familia *Parvoviridae*, que comprende virus DNA monocatenarios con un genoma de aproximadamente 5000 nucleótidos, sin envuelta y con cápside de simetría icosaédrica que oscila entre 20 y 26 nm de diámetro. Es estable a la inactivación por calor (56 °C durante 60 min) y a los solventes de lípidos; sin embargo, es inactivado por la formalina, propiolactona, agentes oxidantes y radiaciones gamma.

El B19 posee una proteína no estructural (NS-1) relacionada con su virulencia y una cápside con dos proteínas estructurales, una de 83 kD (VP-1) y otra, más importante, de 58 kD (VP-2) que supone el 80% del total de la masa proteica y que está contenida en la VP-1. Su cultivo es difícil y hasta ahora sólo se ha conseguido en tres líneas celulares: las megacariocitoblastoides UT7 y MB02 y la eritroleucémica JK1. Actualmente no disponemos de un método adecuado para el aislamiento habitual del virus a partir de muestras clínicas.

EPIDEMIOLOGÍA

La infección por B19 tiene una distribución mundial y su presentación puede ser tanto epidémica como esporádica. Son frecuentes los brotes de EI en las escuelas, generalmente comenzando a finales del invierno o primavera y prolongándose durante el verano. La infección presenta un patrón cíclico, de forma que los episodios epidémicos suelen repetirse cada cuatro o cinco años. También se ha descrito casos de infección nosocomial, pudiendo infectarse tanto los pacientes hospitalizados como el personal sanitario que los atiende.

La primoinfección ocurre más frecuentemente entre los cinco y 15 años (70%); tan sólo un 10% de los casos tiene lugar en edades inferiores y un 20% en superiores. La prevalencia aumenta desde el 2-10% en menores de cinco años hasta el 40-60% en los adultos, superando el 90% en los ancianos. Las infecciones por B19 son, en su mayoría, asintomáticas. En contagios demostrados serológicamente, sólo el 35% presentó manifestaciones clínicas. El mecanismo de transmisión es, fundamentalmente, a través de las secreciones respiratorias, de persona a persona, tras contacto íntimo. Sin embargo, los altos niveles de viremia que se alcanzan durante la infección, incluso en individuos asintomáticos, hacen posible la transmisión a través de transfusiones sanguíneas, factores VIII y IX, albúmina e incluso inmunoglobulinas. La frecuencia de viremia a títulos altos en donantes oscila entre 1/20000 y 1/40000 unidades de sangre durante un período epidémico, por lo que resulta poco común esta fuente de infección.

Es importante conocer que, cuando están presentes las manifestaciones clínicas, ya no existe riesgo de contagio. Por ello, el aislamiento respiratorio sólo está recomendado en pacientes con altas tasas de viremia, como los afectados de CAT o VIH positivos con anemia crónica; las embarazadas y otros enfermos inmunodeprimidos no deben estar en contacto con ellos.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Gracias al estudio realizado por Anderson en voluntarios, a los que inoculó el virus por vía intranasal, se conocieron los cambios clínicos, hematológicos, virológicos y serológicos asociados a la infección por B19. Tras el período de incubación, que oscila entre 5-15 días, aunque excepcionalmente puede prolongarse hasta 28, se presenta una primera fase que dura de 3 a 10 días y cuyos síntomas clínicos son inespecíficos y relacionados con la viremia, como fiebre, malestar, escalofríos, adenopatías, faringoamigdalitis y cefalea. Los parámetros hematológicos (hemoglobina, leucocitos, reticulocitos y trombocitos) disminuyen, aunque generalmente sin trascendencia clínica. El examen de médula ósea revela la presencia de proeritroblastos gigantes vacuolados característicos. La viremia se detecta mediante *dot-blot*-hibridación al sexto día tras la inoculación, es máxima al noveno y desaparece hacia el día 16. Los anticuerpos IgM específicos son positivos en el 90% de los casos a los 2-3 días del comienzo de los síntomas. En esta primera etapa de viremia es cuando también se produce la eliminación respiratoria del virus, detectándose el mismo en faringe, y por consiguiente, es cuando el enfermo se encuentra en el período de máxima contagiosidad. Una segunda fase, que aparece pasados 7-15 días de la primera, se caracteriza por la presencia de una erupción maculo-papular pruriginosa, con o sin artralgia. Los parámetros hematológicos se recuperan, especialmente los reticulocitos, y serológicamente se detectan anticuerpos IgM e IgG específicos. Con la aparición de la erupción o la artralgia desaparece la infectividad del enfermo. Sería, pues, un modelo de infección aguda con desaparición subsiguiente del virus.

Sin embargo, desde la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se sabe que, en la fase aguda, se alcanzan concentraciones superiores a 10^{12} partículas virales por ml de sangre, que bajan drásticamente en las semanas siguientes (10^3 - 10^4 /ml) pero que pueden mantenerse a niveles detectables, incluso en los inmunocompetentes, durante períodos prolongados de tiempo (hasta 164 semanas) aún en presencia de IgG y ausencia de IgM y síntomas. Se desconoce si la persistencia del virus depende de factores del huésped o del mismo virus, y si estas partículas son infecciosas.

En la patogenia de la enfermedad se implican dos mecanismos diferentes que darán lugar a las diversas manifestaciones clínicas. El primero es el resultado de la citotoxicidad sobre las células precursoras eritroides; en efecto, tras la unión de la cápside viral con el antígeno P de las células eritroides, se producen grandes inclusiones intranucleares, con

condensación cromática y vacuolización citoplasmática que indican apoptosis. El segundo mecanismo está condicionado por la respuesta inmune del huésped, de manera que el exantema y las artralgias son el resultado de la formación de inmunocomplejos. El espectro de la enfermedad causada por el B19 se puede encuadrar en los cuatro apartados siguientes.

Infección en los pacientes inmunocompetentes

La principal y más común manifestación es el EI o quinta enfermedad, entidad benigna propia de la edad escolar. Es moderadamente contagiosa. Tras los síntomas iniciales inespecíficos, de infección viral, aparece una erupción eritematosa en las mejillas, "mejillas abofeteadas", y un exantema tipo "encaje" que afecta a tronco y extremidades; aunque generalmente respeta las palmas y las plantas, se han dado casos de afectación de ambas. El exantema es pruriginoso hasta en un 70% de los casos y se resuelve en dos semanas, aunque puede persistir durante meses e incluso recurrir. El proceso no requiere tratamiento. Las complicaciones son raras: artritis, anemia hemolítica, neumonitis, signos de encefalopatías y otros.

En los adultos, los síntomas constitucionales (cefaleas, dolor faríngeo, mialgias, artralgias y molestias gastrointestinales) son más frecuentes y más graves. Aunque también pueden presentar los síntomas clásicos del EI, son más propensos a la artropatía, principalmente de muñecas, tobillos y rodillas. Se ha descrito descamación palmar y plantar asociada a la artritis y en el 50% de los casos picor en los dedos de las manos y pies. En algunos enfermos, especialmente en las mujeres, los signos artríticos duran meses e incluso años. El B19 ha sido identificado como causa de miocarditis y pericarditis en niños y adultos, siendo incluso causante del rechazo de un trasplante cardíaco; también se le ha implicado en algún caso de hepatitis y de síndrome de fatiga crónica.

Infección durante el embarazo

A partir de 1984 son muchas las publicaciones en las que se asocia la infección por este virus con la pérdida fetal en la embarazada, aún en ausencia de síntomas maternos. La necesidad de una mayor producción de hematíes y la incapacidad del sistema inmune fetal para controlar la infección ocasiona una eritroblastosis fetal con el consiguiente aborto o hidropesía fetal no inmune, cuadro considerado actualmente como la principal manifestación de la infección por B19 en la embarazada. Los estudios de prevalencia demuestran que entre el 25-75% de las embarazadas son seropositivas. La tasa de transmisión vertical ronda el 30% y la incidencia de pérdida fetal oscila, según los estudios, entre el 1,7 y el 9%. Por lo general, la infección durante el embarazo conduce al nacimiento de un niño sano.

La mayor mortalidad corresponde a aquellos casos en los que la madre se infectó en el primer trimestre de la gestación. Los anticuerpos maternos transferidos pasivamente al feto son insuficientes para eliminar el virus, que continúa replicándose durante semanas, conduciendo al aborto a las 4-6 semanas de la infección materna, generalmente en el tercer o cuarto mes de gestación. La infección en el segundo trimestre se asocia predominantemente a hidropesía fetal; la aplasia de las células precursoras eritroides provoca una anemia grave con fallo cardíaco, edema generalizado e incluso la muerte, que se produce tardíamente tras varias semanas de la infección materna (hasta 12 semanas). Algunos autores, además de la anemia, apuntan a la existencia de otros mecanismos: lisis eritrocitaria, miocarditis y afectación hepática como causas de la hidropesía y muerte. Se ha comprobado una elevación tanto de la alfa-fetoproteína como de la gonadotropina coriónica maternas en el caso de una afectación fetal por el B19. Sin embargo, ninguno de los dos parámetros ha demostrado ser un marcador útil para evaluar la mala evolución del feto. Los exámenes periódicos por ultrasonidos pueden ser de utilidad para demostrar el edema fetal y la ascitis, incluso siete

semanas antes de la muerte fetal. Muy excepcionalmente, la infección en el tercer trimestre supone riesgo para el feto.

Conviene destacar que no todos los casos de hidropesía conducen a la pérdida fetal. En efecto, publicaciones recientes describen casos de fetos hidrópicos con infección confirmada por B19 que curaron espontáneamente. Respecto al papel teratógeno del virus, se han descrito asociaciones con hidrocefalia, infarto de miocardio, malformaciones del ojo, calcificaciones esplénicas y otros.

Infección en los pacientes con enfermedades hematológicas

Aquellos enfermos que presentan anemia hemolítica crónica, ya sea hereditaria o adquirida (anemia de células falciformes, talasemia, esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica autoinmune, déficit de piruvatoquinasa, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de HEMPAS), e incluso anemia por déficit de hierro y vitaminas, o por pérdida aguda de sangre, pueden presentar un cuadro de CAT por B19. Al igual que en el feto, la mayor necesidad de producción eritrocitaria da lugar a una infección masiva de las células precursoras nucleadas, con el consiguiente bloqueo en la eritropoyesis.

Los síntomas son los relacionados con la anemia aguda (palidez, debilidad, letargia) y generales, compatibles con los de un síndrome pseudogripal. Hay reticulocitopenia periférica, disminución de la hemoglobina, neutropenia, trombocitopenia e incluso pancitopenia. El examen de médula ósea revela proeritroblastos gigantes vacuolados. Los parámetros hematológicos se recuperan en unas tres semanas e incluso, en algunos enfermos, se observa posteriormente la aparición del exantema. El episodio de CAT es único en la vida, ya que la adquisición de IgG neutralizantes protege de futuras reinfecciones.

Aunque la presentación puede ser esporádica, son más frecuentes los brotes epidémicos de CAT por B19, que coinciden con los de EI en el resto de la población. En ocasiones, la infección puede presentarse en enfermos hematológicos sin producir crisis, mientras que otras veces se llega al diagnóstico de una anemia de base, previamente desconocida, tras la presentación de un episodio de CAT.

Estudios de viremia en estos pacientes mediante PCR revelan tan altos niveles de B19 que el Comité de Enfermedades Infecciosas de la Academia Americana de Pediatría recomienda el lavado de manos, así como el uso de guantes y mascarillas para el cuidado de aquéllos. Actualmente se considera que, ante todo ingreso de paciente hematológico con enfermedad febril en el que se sospecha CAT, es recomendable el aislamiento respiratorio.

Infección en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o congénita

Desde que, en 1987, se detectara un caso de infección por el B19 en un niño con síndrome de Nezelof, se han ido incrementando las publicaciones en otras inmunodepresiones congénitas, así como en pacientes con infección por el VIH, leucemias, trasplantados y enfermedades malignas. En todos ellos se produce una infección persistente por B19 con supresión de la médula ósea, manifestándose como una anemia crónica con o sin neutropenia o trombocitopenia. Cabe destacar que, en estos enfermos, generalmente no se evidencia exantema ni artralgia.

La viremia puede persistir durante meses e incluso años a títulos bajos, mientras que las manifestaciones clínicas parecen asociadas a viremias medias-altas o a incrementos en la carga viral ($>10^7$ copias de genoma/ml). Estudios del DNA de B19 procedente de estos pacientes, muestran una mayor variabilidad que los obtenidos en las infecciones agudas. Se

ha especulado con que la persistencia de esta viremia puede estar justificada por la incapacidad en estos enfermos para producir anticuerpos eficaces frente al virus; en este sentido, destacamos los distintos patrones serológicos detectables en este grupo de pacientes: a) ausencia de IgM e IgG, observadas en casos de infección por el VIH, trasplante de médula ósea y leucemias tratadas con quimioterapia; b) persistencia de IgM con IgG negativa o a niveles bajos, en la infección por VIH y en otras inmunodeficiencias adquiridas o congénitas; c) respuesta retardada de anticuerpos en el lupus eritematoso diseminado, y d) presencia de IgG, que carece de especificidad y capacidad neutralizante frente al virus. Aunque la viremia en estos pacientes no alcanza los niveles detectados en los casos de CAT, se aconseja también el aislamiento respiratorio.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección por B19, además de identificar los casos de EI, resuelve gran número de exantemas atípicos, síndromes mononucleósicos y artropatías, hasta ahora de etiología desconocida, y resulta imprescindible en tres situaciones clínicas: los enfermos con CAT, la infección del feto y, muy especialmente, la infección persistente en los inmunodeprimidos, ya que éstas pueden ser susceptibles de tratamiento. Dada la dificultad para cultivar el virus, su diagnóstico se basa en la detección directa de antígenos o DNA y en las pruebas serológicas.

Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos específicos frente a proteínas estructurales es el sistema habitual para el diagnóstico de la infección reciente, estado inmune o estudios de seroprevalencia, pero no siempre es de utilidad en los casos de infección persistente en los inmunodeprimidos y en la afectación fetal. En las CAT la detección de anticuerpos IgM no es suficientemente precoz para algunos autores pero, en nuestra experiencia, éstos fueron altamente positivos a los 3-4 días de la presentación de la crisis.

En los enfermos inmunocompetentes, los anticuerpos IgM se detectan ya al tercer día del inicio de los síntomas en el 90% de los casos de EI, alcanzan su pico a las 2-3 semanas y comienzan a declinar en 1-2 meses, desapareciendo a los 3-6 meses (a veces hasta nueve). Los anticuerpos IgG aparecen días después de los IgM y siguen detectables de por vida, aunque algunos individuos mantienen sólo niveles muy bajos, de manera que, en casos excepcionales, podrían ser posibles las reinfecciones en los enfermos inmunodeprimidos. En éstos, la respuesta inmune puede estar alterada o ausente, como hemos descrito.

La fuente de obtención de antígenos, hasta hace pocos años, ha sido exclusivamente el suero de donantes virémicos, por lo que la disponibilidad de pruebas diagnósticas era insuficiente. Actualmente se utilizan proteínas VP1 y VP2 recombinantes expresadas en varios sistemas, eucarióticos y procarióticos (baculovirus, *Escherichia coli*, células de ovario de hamster y otros), así como proteínas sintéticas. En época reciente se ha conseguido producir también la proteína no estructural NS1 recombinante expresada en sistemas eucarióticos y procarióticos.

El diagnóstico serológico de la infección por el B19 puede realizarse mediante contrainmunolectroforesis, hemaglutinación, inmunofluorescencia indirecta (IFI), radioinmunoanálisis (RIA), *western-blot* y enzimoimmunoanálisis (EIA) simple o de captura. La principal utilidad del RIA es la detección de anticuerpos IgM por inmunocaptura. Para la IFI se utilizan células de insectos infectadas con baculovirus que expresan la VP1. Para

eliminar la interferencia del factor reumatoide hay que tratar previamente los sueros. Los resultados son altamente específicos.

Las pruebas de EIA comercializadas emplean como antígeno VP2, con o sin VP1, utilizando generalmente sistemas de captura para los anticuerpos IgM. Alcanzan cifras de sensibilidad y especificidad iguales o mayores al 90%, en algunos casos hasta el 97%, siendo ambos parámetros superiores en las técnicas con antígenos recombinantes que con antígenos sintéticos. Las técnicas que miden la avidéz de las IgG permiten una estimación más precisa del tiempo de infección que, junto con las técnicas de PCR, podrían aclarar las infecciones persistentes o secundarias en sujetos inmunodeprimidos, así como en el diagnóstico prenatal donde, en un contexto de infección aguda por el B19, no se detecta IgM. En este mismo sentido, en los últimos años, se están desarrollando EIA para estudiar la respuesta IgG frente a epítomos lineales de las proteínas VP1 y VP2 desnaturalizadas químicamente, de modo que reaccionan sólo con IgG de fase aguda y de forma más específica.

Se han comunicado reacciones cruzadas con la rubéola, citomegalovirus, herpes simple, Epstein-Barr, sarampión y *Toxoplasma*. También se han descrito falsos positivos en embarazadas sanas y en sueros con factor reumatoideo, aunque esto último puede ser obviado con las técnicas de inmunocaptura. Existe un suero de referencia internacional que permite comparar los resultados obtenidos por diferentes técnicas, expresándolos en UI/ml.

Los ensayos de hemaglutinación utilizan la capacidad aglutinante del B19 sobre los eritrocitos humanos o de primates para detectar los anticuerpos específicos, IgG e IgM. La simplicidad técnica y la sensibilidad la hacen útil para el diagnóstico de rutina. El *western-blot* utiliza proteínas recombinantes o nativas del B19 pero, dada su complejidad técnica y su coste, no es la prueba recomendable para el diagnóstico habitual.

Los anticuerpos IgM e IgG específicos pueden ser detectados en saliva, siendo ésta de utilidad especialmente en niños durante brotes.

Detección directa

En aquellos casos clínicos en los que el estudio serológico no ayude al diagnóstico, existe la posibilidad de hacer un diagnóstico directo mediante la demostración del virus (microscopía electrónica), la detección antigénica (EIA, RIA, dot-inmunoperoxidasa) o la detección del DNA del virus (*dot-blot*, hibridación en microplaca, hibridación *in situ*, PCR). La microscopía electrónica no es aplicable al diagnóstico habitual por su complejidad y baja sensibilidad.

La técnica de *dot-inmunoperoxidasa*, que detecta las proteínas VP1 y VP2, permite el análisis simultáneo de hasta 94 muestras con una sensibilidad de 2×10^3 partículas víricas, lo que la hace útil en el despistaje en los bancos de sangre porque, si bien no puede discriminar entre unidades de sangre con poca carga vírica, sí permitirá identificar los donantes en fase aguda.

En el mismo sentido sería útil la técnica de *dot-blot-hibridación* que detecta el DNA del B19 usando sondas de DNA o RNA obtenidas por clonación, amplificación mediante PCR u oligonucleótidos sintéticos, siendo la digoxigenina el marcador más usado. La sensibilidad oscila alrededor de 10^3 - 10^4 copias del genoma, lo que la hace útil para el despistaje de viremias medias-altas y para el estudio de muestras agrupadas. Se han descrito modificaciones capaces de detectar una copia. La hibridación en microplaca proporciona también buena sensibilidad.

La técnica de hibridación *in situ* se emplea para la detección de B19 en médula ósea, células de líquido amniótico, sangre de cordón y tejidos, siendo útil sobre todo para el diagnóstico de las infecciones fetales y para el estudio de la patogenia asociada al virus. La técnica más sensible para detectar DNA de B19 es la PCR, que puede ser simple o *nested*, y se realiza sobre diversas regiones del genoma del virus, principalmente sobre secuencias de la región de la cápside. La PCR puede realizarse sobre muestras de plasma o suero, células y tejidos, y nos proporciona un diagnóstico rápido, muy útil en aquellos casos donde no exista producción de anticuerpos, como en los inmunodeprimidos o en el feto, y en otros grupos de alto riesgo donde los síntomas pueden aparecer antes que los anticuerpos (CAT); del mismo modo, su extrema sensibilidad la hace útil en bancos de sangre para el análisis de muestras agrupadas.

Una vez conocida la cinética vírica en la evolución de la infección, un resultado positivo por PCR cualitativa puede ser irrelevante a la hora del diagnóstico de infección aguda y probablemente tendríamos que recurrir a la cuantificación del virus para llegar a un diagnóstico. La cuantificación puede realizarse usando un estándar externo y diluciones de las muestras (semicuantificación) o mediante un estándar interno (técnica competitiva) que se añadiría a cada muestra y sería extraído conjuntamente, obviando las diferencias de eficacia en el proceso de extracción del DNA. Con la asociación técnica competitiva-detección mediante EIA se alcanzan niveles de sensibilidad de 10^2 - 10^5 copias/ml. La técnica de PCR en tiempo real nos proporciona un diagnóstico cuantitativo rápido y sensible para el estudio de pocas muestras.

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

En el EI no es necesario el tratamiento. Sólo en algunas ocasiones se recurre a medicación sintomática y, únicamente en las artralgias, se recomienda el uso de antiinflamatorios no esteroideos.

En la afectación fetal grave está indicado el tratamiento con inmunoglobulinas, e incluso se ha llegado a aplicar transfusión intrauterina, aún cuando la misma puede contribuir directamente a la muerte y habría que valorar la relación riesgo/beneficio. Por otro lado, algunos autores plantean la posibilidad de realizar profilaxis con inmunoglobulinas a las embarazadas seronegativas expuestas claramente al virus. La transfusión sanguínea sí puede estar indicada en casos graves de CAT y está en discusión la administración de inmunoglobulinas intravenosas a estos enfermos con objeto de reducir el tiempo de aplasia.

El tratamiento de la infección persistente en los inmunodeprimidos se basa en la administración de inmunoglobulinas IV a dosis elevadas: 400 mg/Kg/día durante cinco días o 1000 mg/Kg/día durante dos días. Con esto se consigue la desaparición de la viremia aunque, en los pacientes VIH positivos, no es de extrañar que se requiera un segundo ciclo o una administración mantenida de las inmunoglobulinas para tratar las frecuentes recaídas. Tampoco es infrecuente la aparición de artralgias o exantema tras el tratamiento, lo que corrobora que estas manifestaciones están mediadas por el sistema inmune.

Actualmente, y gracias a las técnicas de ingeniería genética, disponemos de vacunas que se hallan en fase de ensayo humano.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON MJ, HIGGINS PG, DAVIS LR *et al.* Experimental parvoviral infection in humans. J Infect Dis 1985; 152:257-265.

- CASSINOTTI P, SIEGL G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:866-867.
- COSSART YE, FIELD AM, CANT B, WIDDOWS D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975; 1:72-73.
- CUBEL RCN, OLIVEIRA SA, BROWN DWG, COHEN BJ, NASCIMENTO JP. Diagnosis of parvovirus B19 infection by detection of specific immunoglobulin M antibody in saliva. *J Clin Microbiol* 1996; 34:205-207.
- GARCÍA-TAPIA AM, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ DEL ÁLAMO C, MIRA J. Infección humana por parvovirus B19. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:95-101.
- GARCÍA-TAPIA AM, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ DEL ÁLAMO C, GIRÓN JA *et al.* Spectrum of parvovirus B19 infection: analysis of an outbreak of 43 cases in Cádiz, Spain. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1424-1430.
- GRUBER F, FALKNER FG, DORNER F, HÄMMERLE T. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol* 2001; 62:2837-2839.
- KAIKKONEN L, LANKINEN H, HARJUNPÄÄ I *et al.* Acute-phase-specific heptapeptide epitope for diagnosis of parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3952-3956.
- MUSTAFA MM, MCCLAIN KL. Infecciones por parvovirus B19. En: Picazo J J, Bouza E (eds). *Infección* 1999. Bilbao: Servisistem 2000 S.L, 1999; pp 11-32.
- PATTISON JR, JONES SE, HODGSON J *et al.* Parvovirus infections and hipoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1981; 1:664-665.
- SEARLE K, GUILLIARD C, WALLAT S, SCHALASTA G, ENDERS G. Acute parvovirus B19 infection in pregnant women - An analysis of serial samples by serological and semi-quantitative PCR techniques. *Infektion* 1998; 26:139-143.
- ZERBINI M, MUSIANI M, GENTILOMI G, VENTUROLI S, GALLINELLA G, MORANDI R. Comparative evaluation of virological and serological methods in prenatal diagnosis of parvovirus B19 fetal hydrops. *J Clin Microbiol* 1996; 34:603-608.
- ZERBINI M, MUSIANI M. 1999. Human parvoviruses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7^a ed. Washington DC: ASM Press, 1999; pp 1089-1098.