Algoritmus laboratorního vyšetření biologických vzorků získaných od pacientů s podezřením na infekci virem opičích neštovic – verze 24. 05. 2022

Na základě upozornění ECDC a zdravotních autorit některých evropských států vydává Státní zdravotní ústav doporučení k diagnostickému postupu při podezření na výskyt případu opičích neštovic na území ČR. **Jakmile bude vysloveno podezření na výskyt infekce, je třeba neprodleně kontaktovat spádové lůžkové infekční oddělení a odbor protiepidemický místně příslušné KHS.**

Etiologie

Monkeypox virus (virus opičích neštovic) z rodu *Orthopoxvirus,* čeledi *Poxviridae*

Přenos - infekční materiál

kapénky z dýchacích cest (jde o větší kapénky, pro přenos je nutný poměrně těsný kontakt s infekční osobou), ostatní biologický materiál (sekret z lézí, krev v exanthematické fázi), kontaminované předměty (lůžkoviny apod.), u cestovatelů může být zdrojem nemocné zvíře, respektive jím kontaminované povrchy a předměty, za přirozený rezervoár viru jsou považováni hlodavci, kteří jsou pravděpodobně zdrojem infekce mimo území obývané primáty, jejich role může být klíčová i v endemických oblastech výskytu MPXV.

Inkubační doba

5-21 dní, typicky 6 – 16 dní

Klinický obraz

1) **prodromální příznaky (1-2 dny)** – zvýšená tělesná teplota nebo horečka, malátnost, intenzivní bolesti hlavy, bolesti svalů, **zvětšení lymfatických uzlin v oblasti krku, axil a třísel**
   a. zasílané vzorky k laboratornímu vyšetření: krev plná nesrážlivá, stěr z horních cest dýchacích (HCD)

2) **enanthem** – erozivní projevy v dutině ústní
   b. zasílané vzorky k laboratornímu vyšetření: stěr z HCD, 2 samostatné razantní stěry z erozí (**nelze zaslat pouze krev**)

3) **exanthem (2-4 týdny)** – simultánní výsev vyrážky, která se může šířit z jedné oblasti těla na ostatní, **u aktuálně hlášených případů, vzhledem k atypické cestě přenosu, se projevy vyskytovaly zejména perianálně a perigenitálně.** Typický postup projevů je makula – vezikula – pustula – eroze – krusta.
   c. zasílané vzorky k laboratornímu vyšetření: vezikulární tekutina, **2** samostatné **razantní** stěry z několika kožních lézí/erozí**, nelze zaslat pouze krev**

Diferenciální diagnostika – plané neštovice (VZV, B01)

V rámci laboratorní diagnostiky opičích neštovic je nutné vzít na zřetel současnou epidemickou situaci ve výskytu planých neštovic, které se každoročně vyskytují na přelomu zimy a jara. Vyšší výskyt onemocnění je pozorován ve 2 až 4letých cyklech, kdy doroste nová generace vnímavých dětí, což ilustruje i přiložená

tabulka. Nižší výskyt planých neštovic v loňském a předloňském roce bude pravděpodobně souviset jednak s vyšším výskytem tohoto onemocnění v roce 2019 a rovněž se zavedenými protiepidemickými opatřeními kvůli onemocnění covid-19, nicméně lze říci, že současná situace koresponduje s výskytem planých neštovic v "předcovidové době" a není nijak výjimečná.

Výskyt planých neštovic v České republice
Duben 2022, porovnání se stejným měsícem v letech 2013 – 2021 a
Leden – duben 2022, porovnání se stejným měsícem v letech 2013 – 2021

B01	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**	**2021**	**2022**
duben	4 912	**7 836**	**7 341**	5 533	5 723	3 800	7 360	2 539	444	8 010
leden-duben	17 726	**24 890**	**21 587**	18 922	19 163	14 210	**22 305**	14 180	3 863	**20 577**

Zdroj: EPIDAT (2013-2017), ISIN (2018 – 2022)

Epidemiologická anamnéza (alespoň jedno z následujících kritérií)

1) pobyt v endemických oblastech (střední a západní Afrika) nebo pobyt v zemích s již nahlášenými případy – aktuálně Velká Británie, Portugalsko, Španělsko, Švédsko, Kanada, USA, Austrálie, Německo, Itálie, Dánsko, Skotsko, Belgie, Francie, případně v dalších zemích dle aktuální situace
2) kontakt s osobou s klinickými příznaky
3) sexuální kontakty zejména v MSM komunitě v zemích s hlášenými případy nebo s partnerem, který v dané zemi pobýval
4) kontakt s divokými nebo domácími zvířaty a volně žijícími hlodavci v endemických oblastech (zejména Afrika), a případně jimi kontaminovanými předměty

Definice případu (case definition)

Potvrzený případ
Osoba s laboratorně potvrzenou infekcí opičích neštovic

- PCR specifická pro MPXV detekci
- PCR specifická pro všechny orthopoxviry potvrzená sekvenací
- orthopoxviry určené elektronovou mikroskopií s výsledkem potvrzeným sekvenací nebo MPXV specifickou PCR

Pravděpodobný případ
1. Osoba s vyrážkou nejasného původu na kterékoliv části těla
A ZÁROVEŇ jakýkoliv z dalších symptomů infekce opičími neštovicemi
A ZÁROVEŇ platí jedno z následujících:

a. pozitivní detekce orthopoxvirů (PCR detekující orthopoxviry bez sekvenace, elektronové mikroskopie, sérologie)
b. epidemiologická vazba na potvrzený nebo pravděpodobný případ infekce v posledních 21 dnech
c. cestovatelská anamnéza do endemických oblastí (země západní Afriky, případně Kongo) v posledních 21 dnech
d. muži praktikující sex s muži
e. osoba praktikující rizikový sex s více partnery v posledních 21 dnech

NEBO

2. Osoba s nevysvětlitelnou generalizovanou nebo lokalizovanou makulopapulózní nebo vesikulopustulózní vyrážkou s centrifugální distribucí, s lézemi vykazující papulky nebo strupy, lymfadenopatií a s jedním nebo více symptomy infekce opičími neštovicemi.

Při ošetřování pacienta a odběru vzorků je naprosto nutné dodržovat BSL2 režim i v případě předchozího očkování ošetřujícího personálu proti variole.

1) pacientovi je třeba věnovat pozornost ihned při příchodu do zdravotnického zařízení a při podezření na opičí neštovice ho izolovat a vyšetřit přednostně
2) zdravotnický personál má při kontaktu s pacientem a zejména při klinickém vyšetření použít jednorázový plášť, jednorázové nitrilové (nesmí být latexové) rukavice, respirátor FFP2, ochranu očí

Pozn.: pro zabránění přenosu infekce je nejdůležitější důsledně se vyhnout přímému kontaktu s lézemi pacienta a se všemi kontaminovanými předměty bez rukavic, používání rukavic a striktní hygiena rukou je zcela prioritní.

Odběr vzorků a vyšetření v SZÚ

Vzhledem ke zvýšenému výskytu planých neštovic je nutné, aby pacientovi byla provedena **základní diferenciálně diagnostická vyšetření**, včetně vyloučení infekcí způsobených herpetickými viry (VZV, HSV-1, HSV-2), **ve zdravotnickém zařízení, které mu poskytuje zdravotní péči**. Vyšetření v místě klinické péče je vždy rychlejší a obvykle optimálnější z hlediska řešení akutního problému.

Biologické vzorky od pacientů se suspektními příznaky je třeba doručit do vyšetřující laboratoře v **SZÚ co nejdříve po vyslovení podezření.**
Všechny suspektní vzorky s pozitivně detekovanými orthopoxviry bez bližšího určení musí být zaslány do SZU ke konfirmaci (zbytky klinického materiálu a izolovaná DNA).
V průvodní žádance na vyšetření je naprosto nezbytné precizně uvést dostupné anamnestické údaje a popis vývoje klinického stavu s časovou osou, případně též výsledky již provedených vyšetření.

Vyšetření v SZÚ

1) Elektronová mikroskopie (ELMI)
2) PCR

Primární klinické materiály určené k vyšetření a k zaslání do SZÚ jsou uvedeny v následující tabulce. Nejvhodnějším materiálem pro vyšetření ELMI je sterilně odebraná vezikulární tekutina z 2-3 eflorescencí nebo krusta z 1-3 eflorescencí. V prodromální fázi (pouze ILI příznaky), je možné odebrat stěr z horních cest dýchacích.
Všechny klinické materiály se uchovávají a transportují při teplotě 2 – 8 °C ve sterilní zkumavce. Odběrové tampóny z kožních lézí se vkládají suché do sterilní zkumavky bez přidání virologického transportního média, nesmí být použit inaktivační roztok.
Vzorky se transportují v trojobalu (tzv. pathopacku) označeném UN 2814.

Příjem vzorků

Klinické vzorky se nesmějí mrazit, musí být doručeny do 24 hodin od odběru při **teplotě (2-8°C) do Národní referenční laboratoře pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění SZÚ budova 4, zvonek „chřipka" v pracovních dnech v době od 7,00 do 15,30 hodin. Pokud bude vzorek doručen do 12,00 hodin, bude znám výsledek PCR vyšetření téhož dne, v případě pozdějšího doručení, bude výsledek znám následující den.**

Bude-li požadováno vyšetření vzorků v SZÚ mimo běžnou pracovní dobu (tj. pondělí až pátek 7,00 až 15,30 hodin) nebo o víkendech, je nutná telefonická domluva předem na čísle 725 191 368.

Typ biologického materiálu	Metoda	Způsob odběru
krev (nesrážlivá v EDTA)	**ELMI/PCR**	cca 9,0 ml krve odebrané do zkumavky s EDTA, posílat především v prodromální fázi nebo v případě komplikovaného klinického průběhu
vezikulární tekutina	**ELMI/PCR**	přímý odběr vezikulární tekutiny z 2-3 vezikul do insulinové stříkačky, zaslaný v kryozkumavce o objemu 1,5 – 2 ml s vnějším závitem, je možné celou stříkačku i s jehlou vložit do vhodného ochranného pouzdra (nepoužitá sterilní zkumavka od suchého stěru bez tamponu, kovový tubus)
stěr z erozí/lézí	**ELMI/PCR**	2 vzorky - razantní odběr větším dacronovým tamponem (nikoli tampóny určené pro stěry z HCD) do sterilní suché zkumavky nebo do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku nebo PBS
stěr z horních cest dýchacích (NSP) případně z erozí/ lézí v dutině ústní	**ELMI/PCR**	1 vzorek - stěr z nasopharyngu a oropharyngu (2 tampóny do jedné zkumavky s 1 ml sterilního fyziologického roztoku nebo PBS), posílat především v prodromální fázi a fázi s nálezem enanthemu
krusta	**ELMI/PCR**	krusty z 1-3 lézí do 2 prázdných sterilních zkumavek (1 až 3 krusty do každé zkumavky)

Doporučená cílená PCR – orthopox diagnostika pro terénní laboratoře:

V blízké budoucnosti bude na trhu dostupná CE IVD PCR diagnostika specifická pro MPXV od výrobců Bioperfectus a LifeRiver, první 3 pozitivní/negativní detekce těmito soupravami je třeba zaslat na konfirmaci do SZÚ (NRL pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění).

Další soupravu nabízí výrobce Altona, která je pouze RUO, ale pravděpodobně bude doporučena WHO stejně jako předchozí soupravy tohoto výrobce.

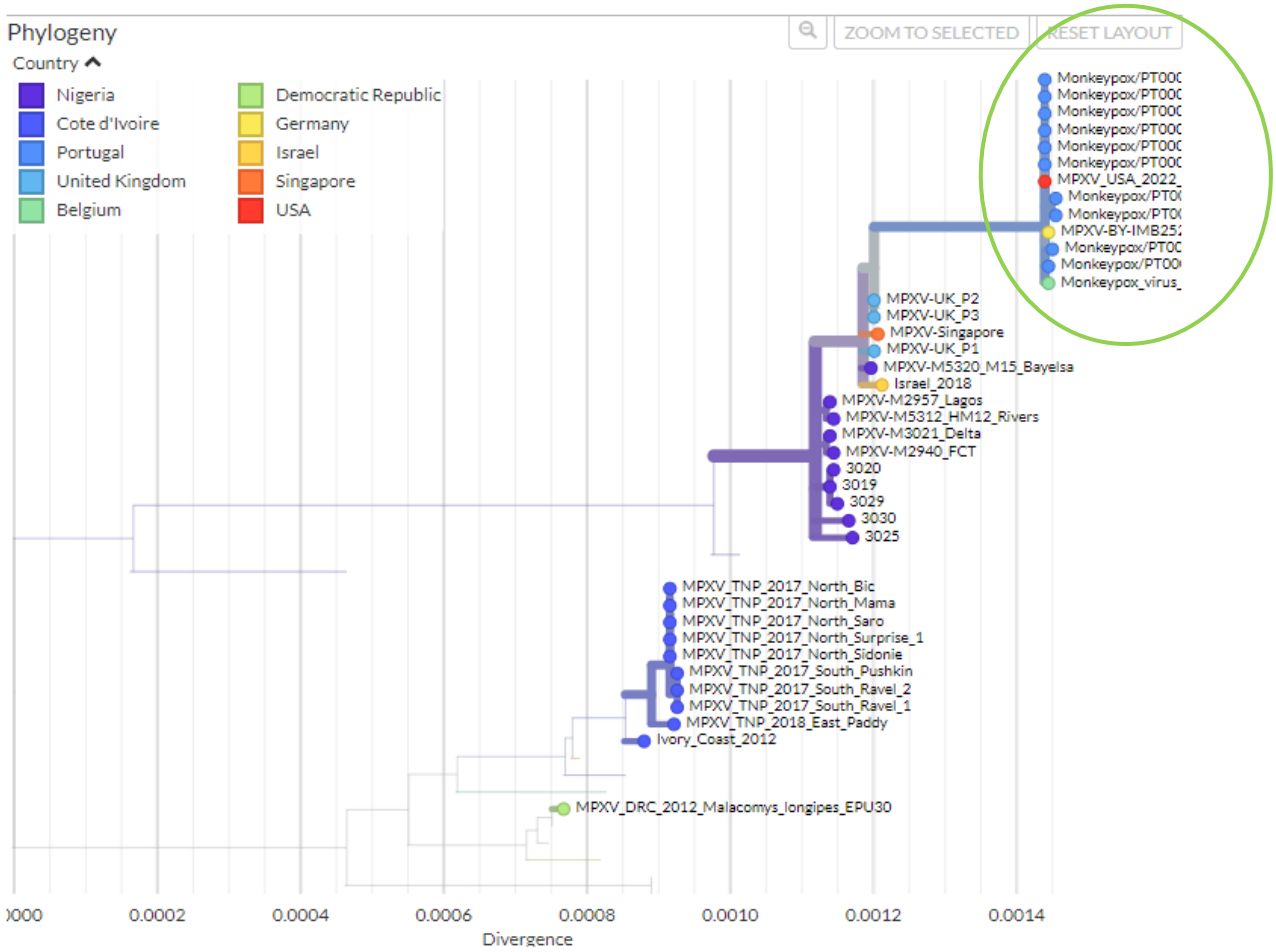
WHO, prostřednictvím sítě EVD Labnet uveřejnilo 3 protokoly pro in house PCR (čerpající z dřívějších publikací):

- Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. Mol Cell Probes. 2010 Apr;24(2):110-3

- Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. Journal of virological methods. 2010;169(1):223-7.

Reference a užitečné odkazy:

- PHE: Monkeypox: information for primary care (https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/850059/Monkeypox_information_for_primary_care.pdf)
- https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-monkeypox-multi-country-outbreak
- Monkeypox (https://www.who.int/health-topics/monkeypox#tab=tab_1)
- Monkeypox cases confirmed in England -GOV.UK https://www.gov.uk/government/news/monkeypox-cases-confirmed-in-england-latest-updates
- Massachusetts public health officials confirm case of monkeypox | Mass.gov https://www.mass.gov/news/massachusetts-public-health-officials-confirm-case-of-monkeypox
- Monkeypox| Poxvirus| CDC (https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/index.html)
- Factsheet for health professionals on monkeypox https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/monkeypox/factsheet-health-professionals
- Monkeypox cases reported in UK and Portugal https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-cases-reported-uk-and-portugal

Příloha

Je známa první evropská sekvenace z Portugalska, virus patří do skupiny West African clade, a je nejblíže příbuzný k sekvencím souvisejícím z exportu z Nigérie do UK, Izraele a Singapuru v roce 2017 a 2019. Blíže viz: https://virological.org/t/first-draft-genome-sequence-of-monkeypox-virus-associated-with-the-suspected-multi-country-outbreak-may-2022-confirmed-case-in-portugal/799. Postupně přibývají laboratoře zveřejňující celogenomové sekvence viru opičích neštovic. Všechny tyto sekvence patří do West African Clade. Na obrázku znázorněny sekvence od 2007 doposud, současné sekvence označeny zelenou výsečí.