

Algoritmus laboratorního vyšetření biologických vzorků získaných od pacientů s podezřením na infekci virem opičích neštovic – verze 24. 05. 2022 *Algorithm for laboratory testing of biological samples from patients with suspected monkeypox virus infection – update of 24 May 2022*

Helena Jiřincová, Hana Zákoucká, Jan Kynčl, Radomíra Limberková

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.

EPIDEMIOLOGICKÁ ANAMNÉZA (ALESPŇ JEDNO Z NÁSLEDUJÍCÍCH KRITÉRIÍ)

1. pobyt v endemických oblastech (střední a západní Afrika) nebo pobyt v zemích s již nahlášenými případy – aktuálně

Tabulka 1: 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)

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 SZÚ ke confirmaci (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 zkuševce. Odběrové tampóny z kožních lézí se vkládají suché do sterilní zkuševky bez přidání virologického transportního média, nesmí být použit inaktivační roztok.

Vzorky se transportují v trojbalu (tzv. pathopacku) označeném UN 2814.

Tabulka 2:

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 závitěm, 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)

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.

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 potvrzení 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): 110-113
- 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): 223-227

REFERENCE A UŽITEČNÉ ODKAZY:

- [1] 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)
- [2] <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-monkeypox-multi-country-outbreak>
- [3] Monkeypox (https://www.who.int/health-topics/monkeypox#tab=tab_1)
- [4] Monkeypox cases confirmed in England -GOV.UK <https://www.gov.uk/government/news/monkeypox-cases-confirmed-in-england-latest-updates>
- [5] Massachusetts public health officials confirm case of monkeypox | Mass.gov <https://www.mass.gov/news/massachusetts-public-health-officials-confirm-case-of-monkeypox>
- [6] Monkeypox | Poxvirus | CDC (<https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/index.html>)
- [7] Factsheet for health professionals on monkeypox <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/monkeypox/factsheet-health-professionals>
- [8] Monkeypox cases reported in UK and Portugal <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-cases-reported-uk-and-portugal>

*MUDr. Radomíra Limberková
Oddělení respiračních, střevních
a exantematických virových nákaz
CEM SZÚ*