

# Specifika laboratorní diagnostiky spalniček a příušnic ve vysoce proočkované populaci

XIII. Hradecké vakcinologické dny  
Kongresové centrum Aldis, Hradec Králové  
5. – 7. 10. 2017

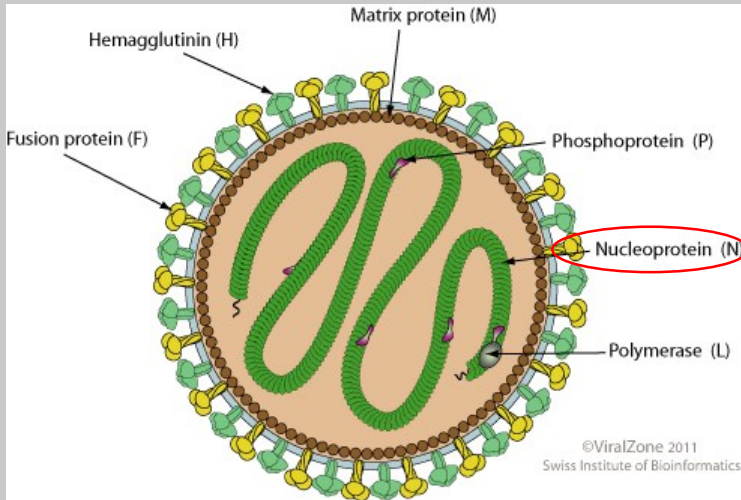
Radomíra Limberková

Řád: Mononegavirales

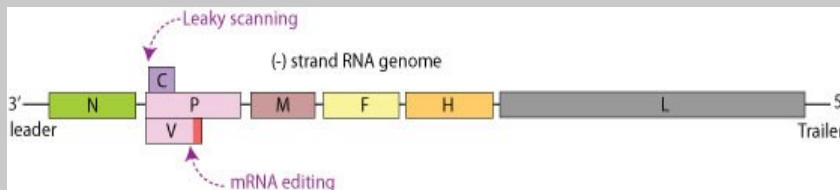
Čeleď: Paramyxoviridae

Podčeleď: Paramyxovirinae

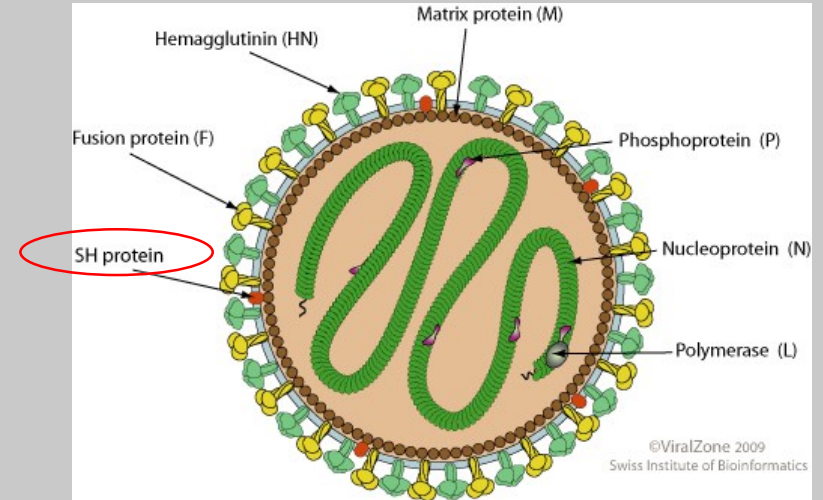
Rod: Morbillivirus Druh: Measles morbillivirus



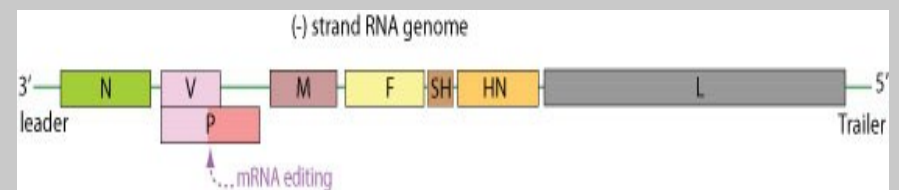
pleiomorfni obalené viriony s helikální symetrií kapsidy, 150-300 nm obálka tvořená z matrix proteinu, obalové glykoproteiny F a H  
**genom:** 1vláknová nesegmentovaná RNA negativní polaritu, 15894nt dlouhá, obalená nukleoproteinem, s P a L proteiny tvoří RNP komplex, kóduje 8 proteinů



Rod: Rubulavirus Druh: Mumps rubulavirus



pleiomorfni obalené viriony s helikální symetrií kapsidy, 100-600 nm obálka tvořená z matrix proteinu, obalové glykoproteiny F a HN, SH  
**genom:** 1vláknová nesegmentovaná RNA negativní polaritu, 15384 nt dlouhá, obalená nukleoproteinem, s P a L proteiny tvoří RNP komplex, kóduje 8 proteinů



# Case definition – laboratorní kritéria

## Laboratorní kritéria - spalničky (min. 1)

### Přímý průkaz

1. izolace viru na TK
2. detekce virové NK

### Nepřímý průkaz (sérologie)

3. pozitivita IgM – nutno vyloučit:
  - *postvakcinační IgM poz. (6 týdnů)*
  - *nespecifické spalničkové IgM*
  - testováním IgM proti zarděnkám, parvoviru B19, EBV a HHV6*
4. sérokonverze či signifikantní vzestup IgG v párovém séru
5. vzestup preexistujících IgG u reinfekcí
6. detekce Ag monoklonálními Ab (IF)

## Laboratorní kritéria - příušnice (min. 1)

### Přímý průkaz

1. izolace viru na TK
2. detekce virové NK

### Nepřímý průkaz (sérologie)

3. pozitivita IgM – nutno vyloučit:
  - *postvakcinační IgM poz. (6 týdnů)*
4. sérokonverze či signifikantní vzestup IgG v párovém séru
5. vzestup preexistujících IgG u reinfekcí
6. detekce Ag monoklonálními Ab (IF)

# Přímý průkaz viru spalniček a příušnic

## Spalničky – přímý průkaz

- PCR (1957 bodů)
- Izolace na TK (413 bodů/1 pasáž)

Vero/hSLAM – GMO - transfekce Vero buněk plasmidem kódujícím gen pro lidskou signální molekulu aktivace lymfocytů – human signalling lymphocyte-activation molecule (hSLAM)

### Klinický materiál

- nasopharyngeální vzorky do VTM, sputum
- moč (nejlépe ranní)
- mozkomíšní mok

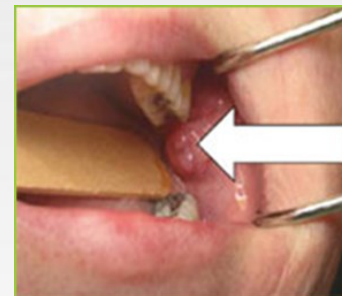
odběr co nejdříve po výsevu exantému

## Příušnice - přímý průkaz

- PCR (1957 bodů)
- Izolace na TK (413 bodů/1 pasáž)
- Sekvenace – určení genotypu

### Klinický materiál

- nasopharyngeální vzorky (bukální stěry, sliny) do VTM
- moč (nejlépe ranní)
- mozkomíšní mok



odběr co nejdříve po začátku klin. manifestace

**Výhody: jednoznačný průkaz infekce, neinvazivní odběr, materiál pro sekvenaci (legislativní povinnost laboratoří: zasílání pozitivních izolátů/vzorků do NRL) \***

# Nepřímý průkaz viru spalniček a příušnic

## Spalničky - nepřímý průkaz

- ELISA IgM kvalit. (328 bodů)
- ELISA IgG kvantit. (328 bodů)

Legislativní povinnost laboratoří zasílat IgM pozitivní séra do NRL ke confirmaci \*

Klinický materiál – sérum, plasma (sliny)

- akutní vzorek – ideálně od 4. dne po výsevu exantému
- rekonvalescentní vzorek nejméně 10 dní po prvním odběru

Nejednoznačný průkaz:

IgM negativní – nutné vyšetření pár. séra (testovat oba vzorky současně! - 984 bodů)

IgM pozitivní – dif. dg IgM anti-rubella, EBV, PV B19, HHV6 - 1640 bodů

## Příušnice - nepřímý průkaz

- ELISA IgM kvalit. (328 bodů)
- ELISA IgA kvalit. (328 bodů)
- ELISA IgG kvantit. (328 bodů)
- HIT (kvantit.) (211 bodů)
- Avidita IgG (328 bodů)

Klinický materiál – sérum, plasma (sliny)

- akutní vzorek – ideálně od 4. dne po začátku klinické manifestace
- rekonvalescentní vzorek nejméně 10 dní po prvním odběru

Nejednoznačný průkaz:

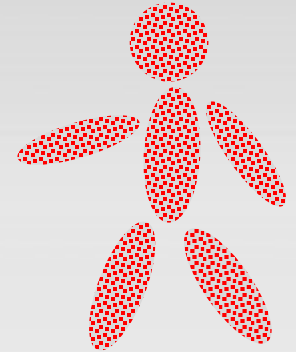
IgM negativní - nutné vyšetření párového séra (testovat oba vzorky současně! - 984 bodů)

# Spalničky a příušnice u vakcinovaných osob

## Primární vakcinační selhání

Charakteristiky primární infekce (primární imunitní odpověď)

- případ splňuje plně kritéria definice klinického obrazu (case definition)
- laboratorní data indikují primární infekci



## Sekundární vakcinační selhání

Charakteristiky reinfekce (sekundární imunitní odpověď)

- případ splňuje jen částečně kritéria definice klinického obrazu
  - pacient se necítí dobře (horečka, bolest hlavy)
  - v některých případech:

**spalničky:** exantém není generalizovaný, chybí konjunktivitida, kašel či rýma

**příušnice:** mírnější průběh onemocnění, významně nižší výskyt komplikací (orchitis cca 4 – 5x méně často u vakcinovaných osob)

- laboratorní data indikují reinfekci



# Primární infekce a reinfekce

	Spalničky a příušnice			Spalničky	Příušnice
	PCR	IgM	IgG	Avidita IgG	Avidita IgG
Primoinfekce	+	++	+	I. odběr nízká	I. odběr nízká
		+	+/-	II. odběr nízká	II. odběr nízká
Reinfekce	+	stoupající	stoupající	I. odběr nízká	I. odběr do 7. dne od PP nízká
		+	++	<b>vysoká</b>	II. odběr nízká
		+/-	+	<b>vysoká</b>	II. odběr <b>vysoká</b>
	rychlá neutralizace viru	-	rychlý vzestup		

Avidita - rozlišení primární a sekundární imunitní odpovědi/primárního a sekundárního selhání vakcinace

PP = první příznaky

# Avidita IgG protilátek

Obecně:

- avidita vyjadřuje sílu vazby mezi polyvalentním antigenem a polyvalentní protilátkou
- čím je protilátka starší, tím je síla vazby Ag-Ab silnější a avidita vyšší
- vhodná metoda pro rozlišení primární a sekundární imunitní odpovědi primárního a sekundárního selhání vakcinace

## Spalničky

- přechod z nízké avidity do vysoké za 7 – 8 týdnů
- nízkoavidní IgG průkaz
  1. primoinfekce
  2. primárního vakcinačního selhání
- vysokoavidní IgG průkaz sekundárního selhání vakcinace

## Příušnice

- přechod z nízké do vysoké za 160 až 180 dní po primoinfekci, pak postupný pokles
- za 6 měsíců od aplikace druhé dávky vakcíny většinou trvale jen nízká avidita
- vysokoavidní IgG průkaz
  1. probíhající infekce u reinfikovaných - sekundárního vakcinačního selhání u vakcinovaných (od 7. dne po začátku on.)
  2. nedávné vakcinace



# IgA protilátky - laboratorní zkušenosti

## Spalničky

(soubor 63 akutních sér od laboratorně potvrzených případů – epidemie 2014)

- Na základě positivity IgM protilátek laboratorně potvrzeno 37 % případů
- Stanovení IgA protilátek zvýšilo sérologickou pozitivitu jen o 13 % (pouze IgA pozitivita u 8/63 sér)
- Doplnění sérologie o stanovení IgA protilátek zvýšilo efektivitu sérologické diagnostiky vyšetření akutního vzorku séra na 50 %

## Příušnice

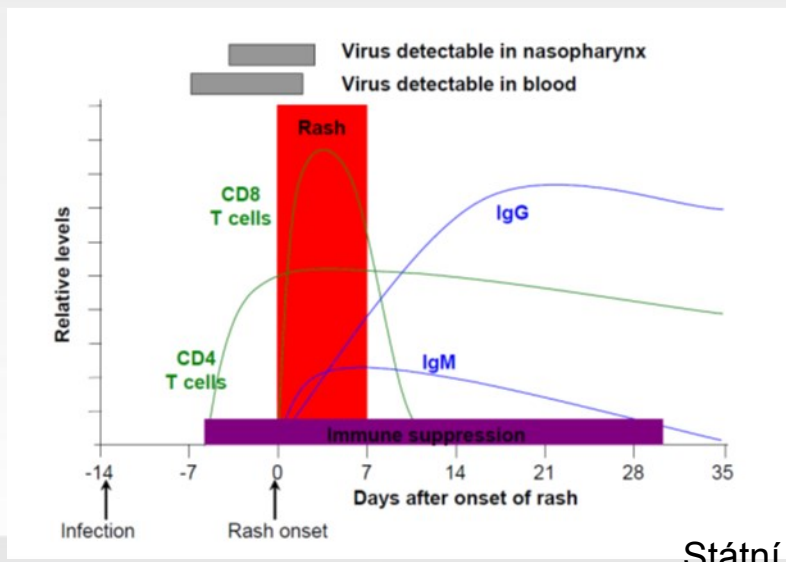
(soubor 45 akutních sér od laboratorně potvrzených případů – epidemie 2015/6)

- Na základě positivity IgM protilátek laboratorně potvrzeno 69 % případů
- Stanovení IgA protilátek zvýšilo sérologickou pozitivitu o dalších 22% (pouze IgA pozitivita u 10/45 sér)
- Doplnění sérologie o stanovení IgA protilátek zvýšilo efektivitu sérologické diagnostiky vyšetření akutního vzorku séra na 91 %

# Spalničky - citlivost laboratorních metod v čase

Metoda	Dny od výsevu exantému	Sérum (%)	Sliny (%)
IgM*	0 - 3	60 - 70	60-70
	4 - 14	90 - 100	90 - 100
	15 - 28	100	100
PCR	0 - 3	< 10	> 80
	4 - 14	< 1	50
	15 - 28	0	≤ 20

\* u reinfekcí se IgM nemusí vytvořit kvůli rychle stoupajícím IgG



Diagnostika v ČR založena na sérologickém vyšetření akutního vzorku séra

## Nevýhoda

IgM neg - doplnit vyšetřením párového séra  
 IgM poz – dif dg EBV, HHV6, PV B19, rubella  
 vyloučit postvakcinační IgM

Vzorky na přímý průkaz jen výjimečně,  
 problém pro molekulární surveillance

# Příušnice – efektivita laboratorních metod v čase

## EFEKTIVNÍ INDIKACE PRVNÍHO LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ

Metoda	Vhodná doba	Ideální doba
PCR, izolace na TK	1 – 9	1 - 5
IgM, IgA, IgG	4 – 10	7 - 10
Avidita IgG	6 - 10	7 - 10

### Pro spalničky i příušnice platí:

**Zásadní informace pro validní interpretaci laboratorního nálezu  
je datum počátku onemocnění a stav vakcinace !!**

- Laboratorní diagnostika v ČR je založená na sérologii akutního vzorku séra
- Čím později je sérum odebráno, tím vyšší výpovědní hodnotu sérologických výsledků získáme – do 3. dne cca 30 % IgM negativních, nutný párový vzorek
- Díky rychle stoupajícím IgG protilátkám u vakcinovaných dochází k brzké neutralizaci viru → průkaznost nákazy pomocí přímého průkazu infekčního vyvolavatele (PCR) rychle klesá

# Molekulární epidemiologie – součást surveillance

Genotypy viru spalniček (sekvenční analýza 450 nt nukleoproteinu N) :

- 8 clades A-H , 24 subclades (A, B1-3, C1-2, D1-11, E, F, G1-3, H1-2)
- 11 z nich od 2006 neaktivních
- dominující genotypy Evropy D4, D8, nověji B3 (typický pro Afriku)

B3



2006



2010



2011



2011

Rok	Genotypy České republiky
2012	D4
2014	B3 – epidemie Ústecký kraj
	D8
2015	D8
2017	B3 – epidemie Moravskoslezský kraj
	D8

Measles Nucleotide Surveillance database (MeaNS) - **36754** sekvencí  
[www.who-measles.org](http://www.who-measles.org)

Sample No.	RKI-17-00595, MVs/Ostrava.CZE/13.17-92
MV genotype	B3
Distinct sequence id in MeaNS	4299, identical to Named Strain "MVs/Dublin.IRL/8.16"

# Genotypy viru příušnic

Genotyp G	2012 (RKI)	2013	2014	2015	2016	2017	2012 - 2017
Praha	2	27	2	15	9	-	55
Pardubice	7	-	-	-	-	-	7
Karlovy Vary	2	-	-	-	-	-	2
Teplice	1	-	-	-	-	-	1
Česká Lípa	-	2	-	-	1	-	3
Rakovník	-	1	-	-	-	-	1
Trutnov	-	1	-	-	-	-	1
Varnsdorf	-	1	-	-	-	-	1
Znojmo	-	1	-	-	-	-	1
Brno	-	-	1	-	-	-	1
Nymburk	-	-	1	-	-	-	1
Č. Budějovice	-	-	-	-	23	-	23
Liberec	-	-	-	3	5	-	8
Plzeň	-	-	-	-	10	7	17
Příbram	-	-	-	-	3	-	3
Třebíč	-	-	-	-	1	-	1
Zlín	-	-	-	-	1	-	1
Jihlava	-	-	-	-	-	1	1
celkem	12	33	4	18	50	8	128

- sekvenční analýza 318 nt SH proteinu
- 12 genotypů příušnic A-N (vyjma E,M)  
C, D, G, H - západní polokoule  
B, F, I - Asie
- v rámci genotypu existují varianty
- v ČR dlouhodobě genotyp G (2005/6)
- genotypy G, C, D, H, I,J neuropatogenní
- izoláty z let 2012 - 2017 jen drobné bodové změny v SH i HN extracelulární doméně bez zvláštních klinických a epidemiologických projevů
- značení genotypů  
MuVs/Praha.CZE/27.15[G]  
MuVi/Praha.CZE/27.15[G]

# Poděkování

Sabině Santibanez, RRL MMR, RKI, Berlín – genotypizace viru spalniček

Helena Jiřincová, CEM, SZÚ – genotypizace viru příušnic

Jitka Procházková, CEM, SZÚ – genotypizace viru příušnic

Alexander Nagy, CEM, SZÚ – genotypizace viru příušnic