

Příušnice: laboratorní průkaz a specifika laboratorních nálezů u vakcinovaných osob

Mumps: laboratory diagnosis and vaccinee-specific laboratory data

Radomíra Limberková

Souhrn • Summary

Laboratorní průkaz příušnicové infekce je u vysoce proočkované populace náročnější kvůli falešně negativním laboratorním nálezům. Nepřítomnost IgM specifických protilátek proti parotitidě je u osob s předchozí imunitní odpovědí na virus příušnic relativně častá, k očekávanému 4násobnému vzestupu titru protilátek u vakcinovaných nemusí dojít ani při vhodně načasovaných odběrech a v neposlední řadě je složitý i přímý průkaz viru. Vakcinovaní vylučují virus v menším množství a kratší dobu, neboť zvýšená hladina rychle nastupujících IgG protilátek jej brzy neutralizuje.

Laboratory diagnosis of mumps infection in a population with a high vaccination coverage is more difficult because of false negative laboratory results. The absence of IgM-specific antibodies against mumps is relatively common in persons with a prior immune response to mumps virus, the expected four-fold increase in antibody titer may not be seen in vaccinated persons even when the sampling is properly timed, and last but not least, direct detection of the virus is rather complicated. Vaccinated persons excrete the virus in smaller quantities and for a shorter time as it is soon neutralized by the increased level of rapidly produced IgG antibodies.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2012; 21(1): 23–25.

Klíčová slova: příušnice – vakcinovaní – laboratorní diagnostika – falešné negativity
Keywords: mumps – vaccinees – laboratory diagnosis – false negativity

Příušnice jsou akutním virovým onemocněním, které je vyvoláno neurotropním a glandulotropním paramyxovirem. Pro onemocnění je charakteristický horečnatý průběh doprovázený bolestivým zduřením jedné nebo více slinných žláz, zejména příušních. Komplikacemi tohoto onemocnění bývají aseptická meningitida (10–15 % nemocných), pankreatitida (relativně vzácně) či orchitida u dospívajících a dospělých mužů (20 %).

Zahájením pravidelného očkování v roce 1987 se snížil výskyt onemocnění a od roku 1997 se u nás příušnice vyskytovaly pouze sporadicky nebo jen v menších lokálních epidemiích. Od roku 2005 dochází k zvýšenému nárůstu počtu onemocnění. Nejvíce postiženou věkovou skupinou se staly osoby mezi 15–24 lety.

Hlavní příčinou současných epidemií je nízká kolektivní imunita, která není dostatečná pro přerušení epidemického šíření viru v populaci. Mezi vnímavé osoby patří jednak nevakcinovaní dospělí, ale i vakcinovaní, u nichž postupně dochází k vymizení protilátek.

Podle posledních sérologických přehledů z roku 2001 mělo protilátky proti příušnicím pouze 72–86 % dětí ve věku 2–15 let a 76–93 % osob od 16 do 39 let [Kříž et al. 2003].

Na rozdíl od jasných diagnostických závěrů u primoinfikovaných: přítomnost IgM protilátek v séru, signifikantní zvýšení titru IgG protilátek v akutním a rekonvalescentním vzorku séra, izolace viru na tkáňových kulturách nebo

průkaz RNA viru pomocí metody RT-PCR, je laboratorní průkaz u vysoce proočkované populace náročnější kvůli falešně negativním laboratorním nálezům.

1. SÉROLOGIE

a) Sérologické testy

Standardní testy pro detekci IgM protilátek a jejich nevýhody

- pro diagnostiku příušnicové primoinfekce dobře fungují EIA (capture IgM) i IFA
- IFA je citlivá k interferenci vysokých hladin IgG specifických protilátek
- použití reagensů k inaktivaci IgG protilátek v séru (Gull-SORB apod.) může vést k falešně pozitivním nálezům IgM protilátek
- standardní diagnostické metody (IgM EIA) dobře fungují v diagnostice příušnicové infekce u vnímavé populace (primoinfekce), u osob s předchozí imunitní odpovědí na virus příušnic však nemusí být specifické IgM protilátky detekovatelné
- akutní vzorky mohou obsahovat signifikantní hladiny specifických příušnicových IgG protilátek zejména u vakcinovaných osob

ELISPOT assay

- sérologický test k průkazu příušnicové infekce u vakcinovaných osob
- v plné krvi detekuje aktivované B buňky (ASC: antibody-secreting B cells; plasmablasty)
- tento test neovlivňují preexistující protilátky v séru
- před zavedením do rutinní diagnostiky je nutné provést další testování, které by určilo optimální načasování odběru vzorků a podmínky pro transport a testování.

– více informací: Don Latner, PhD (grq2@cdc.gov), Carole Hickman, PhD (cjh3@cdc.gov)

b) Interpretace sérologických nálezů

Protektivní titr neutralizačních protilátek

- přítomnost IgG specifických protilátek detekovaných EIA či IFA nezbytně nezaručuje přítomnost neutralizačních protilátek a ochranu před onemocněním
- protektivní titr neutralizačních protilátek není znám a neexistuje ani žádný jiný sérologický parametr korelující s protektivitou

Falešně pozitivní sérologické nálezy

- za interferenci mohou být odpovědné viry parainfluenzy typu 1-3, EBV, adenoviry i HHV6 [Davidkin et al. 2005].

IgG PROTILÁTKY

Pozitivní nález IgG protilátek

- přítomnost specifických příušnicových IgG protilátek nerozliší, zda se jedná o důsledek vakcinace nebo o důsledek expozice divokému viru
- tuto otázku může odpovědět pouze sekvenční analýza založená na sekvenci genů kódujících SH protein (12 genotypů, vakcinální kmen Jeryl-Lynn patří ke genotypu A)

IgG parotitické protilátky – průkaz onemocnění vyšetřením párového séra

- odběr druhého (rekonvalescentního) vzorku séra s odstupem 2–3 týdnů od vzorku akutního – použití kvantitativního testu (VNT, HIT, kvantitativní nebo semikvantitativní EIA)

nevakcinovaní:

- průkaz infekce 4 násobným vzestupem titru IgG protilátek či sérokonverzí

vakcinovaní:

- existující IgG protilátky u vakcinovaných se zvyšují velmi brzy po expozici nákaze (první vzorek séra musí být proto odebrán co nejdříve)

- již v akutním vzorku séra je hladina IgG natolik vysoká, že k očekávanému 4násobnému vzestupu titru protilátek nedojde, i když jsou odběry vhodně načasované.

U vakcinovaných nemusí dojít k očekávanému 4 násobnému vzestupu titru protilátek, i když jsou odběry vhodně načasované.

IgM PROTILÁTKY

Pozitivní nález IgM protilátek v akutním séru

- indikuje probíhající nebo nedávno proběhlé onemocnění či reinfekci
- může být důsledkem nedávné vakcinace (do 6–8 týdnů mohou u vakcinovaných přetrvávat pozitivní nálezy IgM specifických protilátek)

Negativní nález IgM protilátek v akutním séru nevakcinovaní:

- jestliže u sér odebraných ≤ 3 dní od objevení příznaků jsou specifické parotitické IgM protilátky negativní, doporučuje se odebrat další vzorek 5–7 dní od objevení příznaků
- IgM negativní výsledek v druhém vzorku příušnice nevyklučuje, pokud ovšem nejsou také negativní IgG protilátky

vakcinovaní:

- v sérech odebraných za ≤ 10 dní od objevení příznaků je větší pravděpodobnost záchytu IgM specifických parotitických protilátek
- existuje významné procento osob, které nemají detekovatelné protilátky bez ohledu na dobu odběru
- chybějící průkaz IgM protilátek u vakcinovaných je v odborné literatuře obšírně zdokumentován, viz níže

U vakcinovaných osob nemusí být IgM protilátky detekovatelné bez ohledu na načasování odběru.

Tabulka 1: SCHOPNOST DETEKOVAT IGM PROTILÁTKY S OHLEDEM NA VAKCINAČNÍ STATUS

Historie expozice příušnicím	IgM	IgG	Komentář	Literatura
nevakcinovaní; vnímaví (primoinfekce)	+	+ nebo -	IgM mohou mít týdny až měsíce (80–100 %); vznik symptomů může doprovázet přítomnost nízkých hladin IgG	Meurman et al. 1982; Sakata et al. 1985
vakcinovaní 1 dávkou	+ nebo -	spíše +	50 % sér z 1.–10. dne onemocnění jsou IgM+ 50–80 % sér od 10. dne onemocnění jsou IgM+	Narita et al. 1998; Jin et al. 2004; Krause et al. 2007
vakcinovaní 2 dávkami	+ nebo -	spíše +	13–15 % sér z 1.–3. dne onemocnění jsou IgM+ 26–34 % sér je IgM+ (blíže neurčena doba odběru akutních sér)	Bitsko et al. 2008; Rota et al. 2009 *) Sanz et al. 2006; Hachette et al. 2009; Royuela et al. 2011

*) U 30–35 % pacientů se dvěma dávkami vakcíny, od nichž byly vzorky odebrány do 3 dnů od objevení příznaků onemocnění byla prokázána přítomnost RNA viru příušnic, pozitivní IgM protilátky byly prokázány pouze u 13–15 % (pozn.: v časně fázi vývoje onemocnění se IgM protilátky teprve začínají vytvářet a nejen u vakcinovaných, ale i u primoinfikovaných mohou být neprůkazné)

2. DETEKCE VIRU (IZOLACE, RT-PCR)

- izolace viru a průkaz RNA viru patří mezi nejlepší metody průkazu onemocnění příušnicemi - virus je snáze detekovatelný do objevení IgM nebo do počátku vzestupu IgG protilátek
- je nezbytné zohlednit proběhlou vakcinaci - přítomnost viru lze prokázat až do 45 dní po jejím provedení
- úspěšnost obou metod závisí na správném načasování, technice provedení odběru vzorků, zpracování, uchování a transportu vzorků
- nejvhodnější klinický materiál: bukálně-orální výtěry (sliny) a moč, event. likvor
- optimální doba pro odběr klinických vzorků:
bukálně-orální výtěry: nejpozději do 9. dne od nástupu příznaků onemocnění (nejvhodnější doba je těsně před nástupem příznaků do 3. dne klinické manifestace)
moč: do 4. dne od nástupu příznaků (méně vhodná než bukálně-orální výtěry)

Izolace viru na tkáňových kulturách

- nejvhodnější jsou buňky primárních opičích ledvin a VERO buňky (dostupnější)
- identifikace viru se provádí pomocí IFT či RT-PCR
- často je nutno virus pomnožit na tkáňových kulturách, aby se získal vhodný materiál pro sekvenční analýzu

RT-PCR

vakcinovaní:

- vylučují virus v menším množství a kratší dobu, u takto oslabeného vzorku je více pravděpodobné, že detekce viru bude úspěšná použitím metody RT-PCR
- průkaz infekce detekcí RNA je u vakcinovaných dvakrát úspěšnější než průkaz detekcí IgM [Bitsko et al. 2008, Rota et al. 2009].

Vakcinovaní vylučují méně viru a v menším množství, proto je nezbytné provést odběr vzorků na detekci viru v nejčasnější fázi onemocnění, maximálně do třetího dne, dokud nedojde ke zvýšení hladiny rychle nastupujících IgG protilátek.

ZÁVĚR

Při hodnocení laboratorního nálezu je nezbytné vzít v úvahu klinickou manifestaci, epidemiologickou souvislost a v neposlední řadě i vakcinační status, neboť laboratorní nálezy jsou vakcinační historií významně ovlivněny.

Vzhledem k neprůkazné sérologii u vakcinovaných osob stoupá význam přímého průkazu viru příušnic nebo jeho RNA.

Slibnou sérologickou metodou, jejíž výsledky nejsou ovlivněny preexistujícími protilátkami, se zdá být test ELISpot sloužící k detekci aktivovaných B buněk (ASC). Toto diagnostikum je ve fázi testování a není zatím pro rutinní vyšetřování dostupné.

Problematika laboratorní diagnostiky příušnic si vyžaduje naši zvýšenou pozornost. Národní referenční laboratoř proto uvítá spolupráci se všemi pracovišti, která by mohla poskytnout cenný klinický materiál nejen pro sérologické testování, ale zejména pro přímý průkaz infekčního vyvolavatele.

LITERATURA

1. Sanz JC, Mosquera Mdel M, Echevarría JE. Sensitivity and specificity of immunoglobulin titer for the diagnosis of mumps virus in infected patients depending on vaccination status. *APMIS* 2006; 114(11): 788-794.
2. Latner DR, McGrew M, Williams N, et al. Enzyme-Linked Immunospot Assay Detection of Mumps-Specific Antibody-Secreting B Cells as an Alternative Method of Laboratory Diagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18(1): 35-42.
3. Rota JS, Turner JC, Yost-Daljev, et al. Investigation of a mumps outbreak among university students with two measles-mumps-rubella (MMR) vaccinations, Virginia, September-December 2006. *J Med Virol* 2009; 81:1819-1825.
4. Hatchette T, Davidson R, Clay S, Pettipas J. Laboratory diagnosis of mumps in a partially immunized population: The Nova Scotia experience. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009; 20(4):e 157-162.
5. Royuela E, Castellanos A, Sánchez-Herrero C, Barcelona, Spain. Mumps diagnosis and genotyping using a novel single RT-PCR. *J Clin Virol.* 2011; 52(4): 359-362.
6. Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, Rota PA, Lowe L, Iversen SC, Bellini WJ. Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1101-1103.
7. Briss PA, Fehrs LJ, Parker RA, et al. Sustained transmission of mumps in a highly vaccinated population: assessment of primary vaccine failure and waning vaccine-induced immunity. *J Infect Dis* 1994; 169: 77-82.
8. Davidkin I, Jokinen S, Paananen A, Leinikki P, Peltola H. Etiology of mumps-like illnesses in children and adolescents vaccinated for measles, mumps, and rubella. *J Infect Dis* 2005; 191: 719-23.
9. Gut JP, Lablache C, Behr S, Kirn A. Symptomatic mumps virus reinfections. *J Med Virol* 1995; 45: 17-23.
10. Krause CH., Molyneaux PJ, Ho-Yen DO, McIntyre P, Carman WF, Templeton KE. Comparison of mumps-IgM ELISAs in acute infection. *J Clin Virol* 2007; 38: 153-156.
11. Narita M, Matsuzono Y, Takekoshi Y. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 799-803.
12. Sakata H, Tsurudome M, Hishiyama M, Ito Y, Sugiura A. Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: comparison of IgM capture and indirect IgM assay. *J Virol Methods* 1985; 12: 303-311.
13. Rožnovský L, Orságová I, Martinková I, Beneš Č. Epidemická parotitida - pokračující epidemie na východě ČR. *Interní Med.* 2007; 3:133-136
14. Laboratory Testing for Mumps Infection: Materials and Methods for Specimen Collection, Storage, and Shipment Overview of Laboratory Confirmation by IgM Serology Questions and Answers About Lab Testing . <http://www.cdc.gov/mumps/lab/index.html>
15. Kříž B, Beneš Č, Částková J, Šrámová H, Švandová E. In: Serological survey of the antibodies against selected infectious diseases in the Czech Republic, 2001 year. *Central European Journal of Public Health* 2003; 11, Suppl.: 4-67.
16. Definice případů pro hlášení přenosných nemocí do sítě Společenství podle rozhodnutí Evropského parlamentu a Rady č. 2119/98 ES ve znění pozdějších předpisů.

MUDr. Radomíra Limberková
 NRL pro spalničky, zarděnky, příušnice
 a parvovirus B19, SZÚ-CEM, Praha