Додаток 2

Проміжні настанови щодо лабораторних досліджень для виявлення вірусу віспи мавп

Ключові положення

- Метою глобального реагування на спалах віспи мавп у кількох країнах є припинення спалаху.
- Будь-якій людині, яка відповідає визначенню підозрюваного випадку на віспу мавп, має бути запропоновано пройти тестування.
- Рекомендованим типом зразка для діагностичного підтвердження віспи мавп у підозрюваних випадках є матеріал зі шкірного висипу, зокрема мазки ексудату висипу, покришки з більш ніж одного елемента висипу або кірки.
- Лабораторне підтвердження зразків від підозрілих випадків проводиться за допомогою тестування методом ампліфікації нуклеїнових кислот («nucleic acid amplification testing», NAAT), як-от звичайної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або ПЛР у реальному часі. Тест АНК може бути загальним для виявлення ортопоксвірусів (OPXV) або специфічним для вірусів віспи мавп (MPXV, бажано).
- Усі маніпуляції в лабораторних умовах зі зразками, отриманими від підозрілих, імовірних або підтверджених випадків віспи мавп, слід проводити відповідно до підходу, що ґрунтується на оцінці ризику.
- На додаток до тестування методом ампліфікації нуклеїнових кислот, секвенування є корисним для визначення клади вірусу та для розуміння епідеміології. У разі наявності результатів такого дослідження, рекомендується ділитися даними генетичної послідовності MPXV у наявних загальнодоступних базах даних.
- Україна повинна негайно сповіщати ВООЗ відповідно до Міжнародних медико-санітарних правил (ММСП 2005) про позитивні лабораторні результати, включаючи загальний лабораторний тест на виявлення OPXV, який очікує підтвердження.

Вступ

Вірус віспи мавп («monkeypox virus», MPXV) – це дволанцюговий ДНК-вірус, представник роду ортопоксвірусів родини *Poxviridae*. Поксвіруси викликають захворювання у людей та багатьох інших тварин; інфекція, як правило, має шкірні прояви: утворення вузлів у шкірі або дисемінованого висипу. Інші патогенні для людини види ортопоксвірусу (OPXV) – вірус коров'ячої віспи та вірус натуральної віспи (викликає натуральну віспу, яка була ліквідована). Вірус вакцинії також належить до роду OPXV, його використовували для вакцинації людей, і він був ключовим засобом для ліквідації віспи, яку було досягнуто в 1980 році. MPXV отримав свою назву через первинне виявлення у мавп. Цей вірус в основному виявляють у гризунів, однак точний резервуар досконало не визначений. Відомі дві клади MPXV: одна ендемічна в Західній Африці, інша – в басейні ріки Конго.

Типова форма віспи мавп добре описана і складається з короткого гарячкового продромального періоду з подальшим прогресуванням до класичного висипу з ущільненням та центральним пупкоподібним втисненням, який починається на голові або обличчі та прогресує до кінцівок і тулуба. Висип прогресує одночасно від плям, до папул, потім до везикул, згодом до пустул і зрештою до кірочок, які висихають і відпадають через два-чотири тижні. У роті часто з'являється енантема (виразки чи афти), а в процес можуть також залучатись очі та/або ділянка статевих органів. Для віспи мавп характерним є збільшення лімфатичних вузлів. Однак елементи висипу можуть бути геморагічними або зливатися у великі булли. Під час цього спалаху в кількох країнах надходила інформація про нетипове прогресування висипу, зокрема з початком у ділянці геніталій. Багатьох пацієнтів з такою клінічною картиною могли перевіряти на інші інфекційні захворювання до моменту виявлення.

Ці настанови є проміжними рекомендаціями для лабораторій та зацікавлених сторін, які беруть участь у діагностиці віспи мавп. Ці рекомендації були підготовані ВООЗ у співпраці з лабораторними експертами, які мають досвід

роботи з MPXV та OPXV та у їх виявленні, а також з тими, хто має досвід у розробці діагностичних тестів для виявлення OPXV. Ці настанови будуть оновлюватись з появою більш конкретної інформації про цей спалах та збудник.

Показання для тестування

Будь-якій особі, яка відповідає визначенню підозрілого випадку, слід запропонувати тестування. Рішення про тестування повинно ґрунтуватися як на клінічних, так і на епідеміологічних факторах, пов'язаних з оцінкою ймовірності інфекції. Через цілий ряд хвороб та станів, які можуть бути причиною появи висипань на шкірі, а також через те, що клінічна картина при цьому спалаху може бути частіше нетиповою, ніж зазвичай, диференціювати віспу мавп виключно на основі клінічної картини може бути складно, особливо для випадків з атиповим перебігом. Тому важливо враховувати інші потенційні причини окремих проявів з боку шкіри, як-от дисемінованого висипу. Прикладами інших етіологій подібних шкірних уражень на різних стадіях розвитку є вірус простого герпесу, вірус вітряної віспи, контагіозний молюск, ентеровірус, кір, короста, бліда трепонема (сифіліс), бактеріальні інфекції шкіри, алергія на ліки, парапоксвіруси (контагіозна ектима та споріднені хвороби), а також шанкроїд.

Збір, транспортування та зберігання зразків

Процедури безпеки. Повинно бути забезпечено використання відповідних стандартних операційних процедур (СОП), а персонал лабораторії має бути навчений належному одяганню та зніманню засобів індивідуального захисту (ЗІЗ), збору зразків, їх зберіганню, пакуванню та транспортуванню. Усі зразки, зібрані для лабораторних досліджень, слід розглядати як потенційно інфекційні та поводитися з ними обережно. Необхідно вжити заходів для мінімізації ризику лабораторної передачі на основі оцінки ризику під час тестування звичайних клінічних зразків від пацієнтів з підтвердженою або підозрюваною віспою мавп.

Серед них може бути обмеження кількості зразків для тестування персоналу лише персоналом із доведеною компетентністю, носіння відповідних ЗІЗ, суворе дотримання стандартних запобіжних заходів та уникнення будь-яких процедур, які можуть утворювати інфекційні аерозолі. Якщо це доцільно та можливо, персоналу слід розглянути питання вакцинації. Серед ефективних дезінфектантів – четвертинні амонієві сполуки та 0,5% (200 ppm) гіпохлорит (свіжого приготування).

Під час збору зразків і поводження з ними має бути забезпечено суворе дотримання необхідних заходів контролю та профілактики інфекцій (відповідні настанови розробляються).

Відбір зразків. Рекомендований тип зразка для лабораторного підтвердження віспи мавп – це матеріал зі шкірного висипу, зокрема мазки з поверхні ураження та/або ексудат, покришки з більш ніж одного елементу висипу або кірки. Забір матеріалу з місця ураження шкіри повинен проводитись достатньо інтенсивно, щоб зібрати необхідну кількість вірусної ДНК. Можна використовувати як сухі тампони, так і тампони, поміщені у транспортні середовища для вірусів (viral transport media, VTM). В одну пробірку слід зібрати матеріал з двох елементів висипу, бажано таких, які відрізняються за зовнішнім виглядом, а також з різних місць на тілі. Покришки висипу, скоринки та рідину везикул не слід змішувати в одній пробірці. Якщо ресурси дозволяють, можна зібрати дві пробірки, щоб звести до мінімуму ризик неякісних відбору проб чи інгібіторів, однак перевіряти слід лише одну з них, другу – лише у випадку, якщо перша дає непереконливі результати. На додаток до зразків шкірних уражень рекомендується взяти мазок з ротоглотки. Однак дані про точність таких зразків для діагностики віспи мавп обмежені, тому негативний результат мазка з горла слід інтерпретувати з обережністю.

Оскільки поточний спалах все ще розслідується, можливим є збір додаткових типів зразків для дослідницьких цілей, якщо на це дає дозвіл відповідна етична комісія, а також якщо є достатня лабораторна та медична експертиза для їх

безпечного збирання, обробки та зберігання. Такі зразки можуть включати сечу, сперму, ректальний та/або генітальний мазок за показаннями на основі клінічної картини, зокрема локалізації уражень. Кров з додаванням EDTA також може слугувати для виявлення MPXV, але вона може не містити вірус у таких значних кількостях, як зразки з уражень, оскільки будь-яка вірусемія виникає на початку перебігу інфекції, зазвичай у продромальному періоді – до того, як ушкодження шкіри стають явними. Біопсію елементів висипу під час макулярної стадії слід розглядати лише за клінічними показаннями та виконувати лише персоналу з відповідною підготовкою. Такі додаткові типи зразків не призначені для звичайних діагностичних цілей і їх не потрібно збирати за межами дослідних установ. Більш детальна інформація про збір і зберігання зразків наведена в кінці цього додатка.

Окремо виявлення антитіл у плазмі або сироватці крові не слід використовувати для діагностики віспи мавп. Однак виявлення антитіл класу IgM у нещодавно захворілих пацієнтів в гострій стадії або антитіл класу IgG у парних сироватках, відібраних з інтервалом щонайменше 21 день, причому зі збором першого зразку протягом першого тижня хвороби, може допомогти в діагностиці, якщо протестовані зразки дають непереконливі результати. Нещодавня вакцинація може утруднити оцінку результатів серологічних тестів.

Пакування та транспортування зразків від пацієнтів. Зразки слід зберігати в охолодженому або замороженому вигляді протягом години після відбору та транспортувати в лабораторію якомога швидше. Правильне поводження та зберігання зразків під час транспортування є важливими для точного тестування (більше в кінці додатка). Транспортування зразків має відповідати всім наявним державним та/або міжнародним нормам, зокрема Типовим правилам ООН («UN Model Regulations») та будь-яким іншим затвердженим правилам залежно від виду транспорту, який використовується. Для міжнародного транспортування зразки від підозрілих, імовірних або підтверджених випадків захворювання на віспу мавп, зокрема зразки від пацієнтів, ізоляти вірусів та культури, повинні

транспортуватися як категорія А, UN2814 «інфекційна речовина, що здатна вражати людей». Усі зразки, що транспортуються, повинні мати відповідне потрійне пакування, маркування та документацію. Для доставлення потрібен сертифікований вантажовідправник. Детальна інформація про вимоги до транспортування інфекційних речовин наявна у Керівництві ВООЗ щодо правил транспортування інфекційних речовин на 2021-2022 рр. («WHO Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022»)

Зберігання зразків. Зразки, відібрані для виявлення MPXV, слід охолодити (від 2 до 8°C) або заморозити (-20°C або нижче) протягом однієї години після збору. Якщо тривалість транспортування перевищуватиме 7 днів, зразки слід зберігати при температурі -20°C або нижче. Тривале зберігання зразків (>60 днів після збору) рекомендується при температурі -70°C. Вірусна ДНК, наявна в матеріалі зібраному зі шкіри, є відносно стабільною, якщо її зберігати в темному, прохолодному середовищі, що можна розглядати як прийнятний варіант, коли холодовий ланцюг недоступний. Все ж, транспортування при кімнатній температурі не рекомендується, допоки подальші дослідження не підтвердять збереження якості зразка. Слід уникати повторних циклів замороження-розмороження, оскільки вони можуть знизити якість зразків. Крім конкретних матеріалів для збору, зазначених в кінці додатка, інші необхідні матеріали та обладнання можуть включати: транспортні контейнери та пакети для збору зразків і потрійне пакування, холодильники та термопакети або сухий лід, стерильне обладнання для забору крові (наприклад, голки, шприци та пробірки), етикетки та перманентні маркери, ЗІЗ та матеріали для дезактивації поверхонь.

Методи та алгоритм лабораторних досліджень

Тестування на наявність MPXV має проводитись у відповідно обладнаних лабораторіях персоналом, навченим необхідним технічним процедурам та процедурам безпеки. Підтвердження факту зараження вірусом віспи мавп ґрунтується на тестуванні методом ампліфікації нуклеїнових кислот з

використанням звичайної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або ПЛР у реальному часі для виявлення унікальних послідовностей вірусної ДНК. ПЛР можна використовувати окремо або в поєднанні з секвенуванням. Деякі протоколи включають два етапи, перший з яких – ПЛР для виявлення OPXV без уточнення виду, а другий – на основі ПЛР або використовувати секвенування – виявлення конкретно MPXV. Перед використанням певного методу тестування клінічних зразків людини в лабораторії, він повинен бути підтверджений та/або перевірений у лабораторії відповідим підготовленим персоналом.

Реагенти. Реактиви слід зберігати відповідно до рекомендацій виробника. Існує ряд наборів послідовностей праймерів і зондів для ПЛР-аналізів на OPXV і, зокрема, MPXV, які були опубліковані в літературі і можуть бути використані для самостійної розробки аналізів у лабораторіях з відповідною потужністю. Набори для ПЛР для виявлення OPXV або, зокрема, MPXV, знаходяться на стадії розробки, але комерційні набори для ПЛР або серологічні набори не є наразі широко доступними. Найкраща практика полягає в тому, що позитивний контроль слід включати у низькій (вище межі виявлення), проте легкій для виявлення концентрації; включення матеріалів для контролю якості, де це можливо, може допомогти у контролі будь-яких проблем з аналізами. Контроль повинен надавати інформацію про (1) якість зразка, (2) якість нуклеїнових кислот та (3) якість процесу. ПЛР може бути надзвичайно чутливим методом, тому слід докласти зусиль, щоб обмежити контамінацію, і використовувати негативний контроль під час кожного запуску, щоб переконатися, що контамінація відсутня. Контроль цілісності зразка (наприклад, РНКаза Р), контроль екстракції, позитивний та інгібувальний контроль можуть допомогти відрізнити хибно негативний від істинно негативного результату. Контролі слід використовувати відповідно до лабораторних СОП. Якщо будь-який з контрольних аналізів невдалий, тестування слід повторити.

Утилізація відходів. Усі відходи, які можуть містити MPXV, повинні бути знезаражені перед утилізацією за допомогою схваленого спеціальними

лабораторними процедурами методу, як-от автоклавування або хімічної дезінфекції.

Електронна мікроскопія. Електронна мікроскопія може бути використана для оцінки зразка на наявність потенційного вірусу віспи, але зважаючи на наявність молекулярних аналізів і на необхідність високих технічних навичок та обладнання, цей метод зазвичай не використовується для діагностики поксвірусних захворювань.

Вірусна культура. Ізоляція вірусу не рекомендована як рутинна діагностична процедура і повинна проводитися лише в лабораторіях з відповідним досвідом та умовами утримання. Оскільки ці методи не рекомендуються як частина рутинної діагностики, конкретні деталі цих методологій не висвітлюються в цьому документі.

Інтерпретація лабораторних результатів

При підтвердженні зараження вірусом віспи мавп слід враховувати клінічну та епідеміологічну інформацію. Позитивне виявлення за допомогою ПЛР-аналізу OPXV з подальшим підтвердженням MPXV за допомогою ПЛР та/або секвенування, або позитивне виявлення за допомогою ПЛР-аналізу MPXV у підозрілих випадках в ендемічних та неендемічних регіонах свідчить про підтвердження зараження вірусом віспи мавп. Хоча й проведення специфічного підтверджувального тестування на наявність MPXV є бажаним, виявлення за допомогою ПЛР-аналізу OPXV вважається достатнім для лабораторного підтвердження підозрілих випадків у неендемічних країнах. Україна повинна негайно повідомляти ВООЗ про лабораторно підтверджені випадки.

Якщо попри негативні результати ПЛР, клінічна картина та епідеміологічні дані свідчать про зараження вірусом віспи мавп, серологічні тести можуть бути корисними для подальшого дослідження інфекції в епідеміологічних цілях. Ряд факторів може сприяти отриманню хибно негативних результатів, наприклад,

погана якість зразка, неправильне поводження або транспортування, або технічні причини, пов'язані з самим тестом, наприклад, порушення методики екстракції ДНК.

На додаток до використання секвенування для діагностики, дані генетичної послідовності («genetic sequence data», GSD) також можуть надати цінну інформацію, яка допоможе зрозуміти походження, епідеміологію та характеристики вірусу, наприклад, чи виникають випадки в результаті одноразового або багаторазового занесення з інших місць. На цьому етапі рекомендується секвенування MPXV із якомога більшої кількості позитивних зразків від різних пацієнтів. У разі наявності результатів генетичного секвенування, рекомендується завантажувати дані генетичної послідовності MPXV у наявні загальнодоступні бази даних. GSD можна згенерувати за допомогою методу Сенгера або методів секвенування наступного покоління («next generation sequencing», NGS).

Управління біологічними ризиками

Рекомендується, щоб усі маніпуляції зі зразками, отриманими від підозрілих, ймовірних або підтверджених випадків захворювання на віспу мавп, в лабораторії проводились відповідно до підходу, що ґрунтується на оцінці ризику. Кожна лабораторія повинна проводити локальну (тобто внутрішню) оцінку ризиків. Під час маніпуляцій з біологічними зразками повинні виконуватися основні вимоги біобезпеки, подібні до тих, які раніше називалися рівнем біобезпеки 2 («biosafety level 2», BSL 2), і слід застосовувати посилені заходи контролю на основі внутрішньої оцінки ризиків.

Вірусом віспи мавп можна заразитися на етапі обробки зразка через забруднений матеріал або порушення методології процесів. Таким чином, на додаток до основних вимог рекомендоване дотримання посилених заходів біобезпеки для клінічного тестування без розмноження вірусу, зокрема такі:

- зразки від пацієнтів з підозрою на зараження вірусом віспи мавп необхідно обробляти у робочій шафі біобезпеки I або II класу до інактивації зразка (зразки, інактивовані належним чином, не потребують шафи біобезпеки);
- персонал лабораторії повинен одягати відповідні ЗІЗ, особливо для роботи зі зразками перед інактивацією;
- якщо для процедури потрібне використання центрифуги, слід використовувати захисні чаші або герметичні ротори.

Слід розглянути додаткові заходи контролю для конкретних процедур, зокрема процедур, що утворюють аерозолі, відповідно до внутрішньої оцінки ризику. Для отримання додаткової інформації щодо основних вимог біобезпеки та посилених заходів контролю, скористуйтесь четвертим виданням Посібника ВООЗ з біобезпеки («WHO Biosafety Manual»).

Збір і зберігання зразків

Вид зразка	Збір матеріалу	Температура зберігання	Мета збору
Матеріал з елементів висипу, зокрема: – мазки ексудату; – покришки висипу; – кірки	Тампони з дакроном або поліестером із флокуванням з транспортним середовищем для вірусів або сухий тампон	Охолодити (2-8 °C) або заморозити (-20 °C або нижче) протягом 1 години після збору; -20°C або нижче через 7 днів	Рекомендовано для постановки діагнозу
Мазок з ротоглотки	Тампони з дакроном або поліестером із флокуванням з транспортним середовищем для вірусів або сухий тампон	Як вище	Рекомендовано для постановки діагнозу, якщо можливо, на додаток до матеріалу з елементів висипу
Ректальний та/або генітальний мазки	Тампони з дакроном або поліестером із флокуванням з транспортним середовищем для вірусів або сухий тампон	Як вище	Можливий варіант для наукових досліджень (відповідно до етичних рекомендацій)

Сеча	Стерильна пробірка	Як вище	Як вище
Сперма	Стерильна пробірка	<1 год при кімнатній температурі, потім – 20°C або нижче	Як вище
Цільна кров	Стерильна пробірка з EDTA	Як вище	Як вище
Сироватка крові	Пробірки для виділення сироватки	Охолодити (2-8 °C) або заморозити (-20 °C або нижче) протягом 1 години після збору; -20°C або нижче через 7 днів	Серологія як додатковий варіант для постановки діагнозу (відповідно до етичних рекомендацій)
Плазма	Пробірка з EDTA	Як вище	Як вище