

ANALIZA DATELOR PRIVIND CONFIRMAREA DE LABORATOR A CAZURILOR DE RUJEOLĂ

Victoria BUCOV, Laura ȚURCAN, Irina MALANCO,
Anatolie MELNIC, Ala HALACU,
Agenția Națională pentru Sănătate Publică

Rezumat

Scopul acestui articol este analiza investigațiilor de laborator realizate în vederea confirmării diagnozei de rujeolă în timpul erupțiilor epidemice din anul 2018. Pentru determinarea IgM rujeolici a fost folosită metoda ELISA. Genotiparea tulpinilor circulante ale virusului rujeolic a fost realizată în Laboratorul regional de referință al OMS. Diagnoza clinică de rujeolă a fost confirmată prin datele pozitive serologice în cazuri necesare – 56,8% din 340 cazuri. Probele de urină pentru investigații prin metode de biologie moleculară au fost colectate de la bolnavi de rujeolă, diagnoza cărora a fost confirmată prin metoda serologică, au fost colectate din șase teritorii de la cazuri importate, cazuri legate cu cele de import și cazuri cu transmitere locală. În total au fost supuse genotipării 19 mostre. Genotipurile virusului rujeolei circulante în țară în 2018 au inclus patru tipuri: D8 linia genetică MVs / Cambridge.GBR / 5,16; D8 MVs / Gir Somnath.IND / 42,16; B3 linie genetică MVs / Dublin.IRL / 8,16 / și D8 MeaNS-5484. Aceste genotipuri sunt răspândite pe larg în mai multe țări din lume și europene, inclusiv țările limitrofe. Depistarea de la două cazuri de rujeolă, nelegate epidemiologic, ale genotipului virusului care nu a circulat printre contactele lor evidențiate sugerează ideea că acești bolnavi au avut legături epidemiologice neevidențiate și, posibil, circulația virusului rujeolei în țară era la un nivel mai înalt decât cel înregistrat.

Cuvinte-cheie: rujeolă, ELISA, genotipare

Summary

Analyzing data for laboratory confirmation of measles cases

The purpose of this article is to analyze the results of laboratory tests performed to confirm the diagnosis of measles during an outbreak in 2018. An enzyme immunoassay (ELISA) was used to determine measles antibodies such as IgM and IgG. Genotyping of circulating measles virus strains was carried out at the WHO Regional Reference Laboratory. Clinical diagnosis of measles is confirmed by positive serological by positive serological data in necessary cases – 56.8% of 340 cases. Urine samples for molecular biological studies were taken from patients with measles, the diagnosis of which was confirmed by a serological method, samples were taken from 6 territories, from imported cases, related to imported and with local transmission, in total 19 samples were genotyped. The measles virus genotypes circulating in the country in 2018 included four types: the D8 MVs / Cambridge.GBR / 5,16 gene line; D8 MVs / Gir Somnath.IND / 42,16; B3 gene line MVs / Dublin.IRL / 8,16 / and D8 MeaNS-5484. These genotypes are widely circulated in EU countries, including neighboring countries. Detection of two epidemiologically unrelated cases of measles with the genotype of the virus that did not circulate among their contacts suggests that the

circulation of the measles virus in the country was at a higher level than registered.

Keywords: measles, ELISA, genotyping

Резюме

Анализ данных по лабораторному подтверждению случаев кори

Целью данной статьи является анализ результатов лабораторных исследований, выполненных для подтверждения диагноза кори во время эпидемических вспышек в 2018 г. Иммуноферментный анализ (ИФА) был использован для определения коревых антител типа IgM. Генотипирование циркулирующих штаммов вируса кори было проведено в Региональной референс-лаборатории ВОЗ. Клинический диагноз кори подтвержден положительными серологическими данными в необходимых случаях – 56,8% из 340 случаев. Пробы мочи для молекулярно-биологических исследований были отобраны у пациентов с корью, диагноз которых был подтвержден серологическим методом. Пробы были отобраны у больных из 6 территорий, от завозных случаев, от больных, связанных с завозными случаями и случаев с локальной передачей кори. Всего были генотипированы 19 образцов. Генотипы вируса кори, циркулирующие в стране в 2018 году, включали четыре типа: линию генов D8 MVs / Cambridge.GBR / 5,16; D8 MVs / Gir Somnath.IND / 42,16; B3 генная линия MVs / Dublin.IRL / 8,16 / и D8 MeaNS-5484. Эти генотипы широко распространены во многих странах мира и Европы, включая и соседние страны с Республикой Молдова. Выявление двух эпидемиологически не связанных случаев кори с генотипом вируса, который не циркулировал среди их контактов, позволяет предположить, что циркуляция вируса кори в стране была на более высоком уровне.

Ключевые слова: корь, ИФА, генотипирование

Introducere

În prezent, cele șase regiuni ale Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) realizează programe de eliminare a rujeolei. În 2010, toate cele 53 de țări din regiunea europeană a OMS și-au reconfirmat angajamentul de a elimina rujeola, acest obiectiv fiind inclus ca o prioritate în *Planul european de acțiune privind vaccinurile pentru anii 2015-2020*. Unul dintre principiile-cheie ale eliminării rujeolei este asigurarea, alături de acoperirea vaccinală la nivel nu mai redus de 95%, a unui sistem de supraveghere puternic, cu un element indispensabil de confirmare a cazurilor suspecte la rujeolă prin metode de laborator [1-3].

Confirmarea de laborator a rujeolei este importantă pentru a permite identificarea sursei de infecție și contactarea la timp a serviciilor locale de sănătate publică [4, 5]. Metode de laborator sunt propuse și pentru evaluarea și stabilirea faptului vaccinării la persoanele fără date despre imunizare [6].

Confirmarea de laborator a cazurilor de rujeolă prin detectarea ARN-ului specific se consideră singura modalitate de a distinge tulpinile de tip sălbatic și vaccinal [7, 8]. Metodele de laborator sunt utilizate de asemenea pentru clasificarea finală a tuturor cazurilor cu erupții cutanate și febră, în contextul programului de eliminare a rujeolei în cadrul supravegherii de rutină [9].

Activitatea de laborator a țărilor este unită în cadrul rețelelor specializate. OMS coordonează supravegherea globală de laborator a infecțiilor prevenibile prin vaccinare, inclusiv rujeola (laboratoare GMRLN) [10].

Pentru detectarea anticorpilor rujeolici specifici este folosită metoda imunofermentativă – ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A fost demonstrat că procentul de probe pozitive depinde de termenul colectării probelor și este cel mai înalt în perioada inițială a bolii. În experiențe comparative a fost demonstrată specificitatea înaltă a diferitor test-sisteme pentru ELISA și PCR [11, 12].

Tehnicile de epidemiologie moleculară permit definirea distribuției geografice a genotipurilor de virus, monitorizarea transmiterii virusului și detectarea întreruperii circulației, confirmarea eficienței strategiilor de vaccinare etc. Pentru realizarea acestei investigații, este folosită reacția în lanț a polimerazei (RT-PCR) cu eficiența maximă de detecție în primele zile după debutul bolii și maxim la șapte zile după apariția erupțiilor [13-16].

Este important de inclus laboratoarele în cadrul rețelei electronice unice, de creat o bază de date naționale privind toate aspectele legate de supravegherea și controlul maladiilor-țintă din programele de imunizare [17].

Scopul acestui studiu este analiza investigațiilor de laborator realizate în vederea confirmării diagnozei de rujeolă.

Material și metode

Examinarea probelor sangvine de la persoanele cu suspectare la rujeolă la prezența anticorpilor de tip IgM specifici a fost realizată prin metoda ELISA cu următoarele test-sisteme: Siemens, Enzygnost®, *Anti-Measles-Virus/IgM* (Germania, sensibilitatea – 100%, specificitatea – 100%); Euroimmun *Anti-Measles Virus NP ELISA (IgM)* (Germania, sensibilitatea – 100%, specificitatea – 100%), recomandate de OMS, și iNovaTec, NovaLisa® *Measles Virus IgM* (Germania, sensibilitatea – 100%, specificitatea – 100%), procurate

de Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale (MSMPS). În total au fost investigate 291 de persoane cu suspectare la rujeolă.

Probele de urină pentru investigații prin metode de biologie moleculară au fost colectate de la bolnavi de rujeolă, diagnoza cărora a fost confirmată prin metoda serologică. Probele au fost colectate din șase teritorii de la cazuri de rujeolă importate, cazuri legate cu cele de import și cazuri cu transmitere locală a infecției. În total au fost supuse genotipării 19 mostre. Genotiparea a fost realizată în Laboratorul regional de referință al OMS (or. Moscova, FR).

Rezultate și discuții

Republica Moldova a aderat la strategia de eliminare a rujeolei, inițiată de Biroul Regional pentru Europa (BRE) al OMS în 2005. Supravegherea și controlul rujeolei este realizat conform prevederilor *Programului național de imunizări*, Ordinului MS nr. 37 din 23.01.2006 *Cu privire la strategiile de eliminare a rujeolei și rubeolei și măsurile de supraveghere a acestor infecții*, dispoziției MS nr. 336-d din 04.06.2015 *Cu privire la intensificarea supravegherii și a controlului rujeolei și rubeolei*.

Baza controlului rujeolei o constituie realizarea imunizărilor cu vaccinul viu atenuat ROR (rujeolă-oreion-rubeolă) conform calendarului național de imunizări la vârstele de 12 luni, 6-7 și 14-15 ani, cu acoperirea vaccinală nu mai joasă de 95% în toate unitățile teritoriale.

Măsurile de supraveghere includ:

- depistarea și examinarea cazurilor suspecte la rujeolă și rubeolă de către instituțiile de asistență medicală primară și spitalicească în comun cu medicii-infecționiști și epidemiologi, cu spitalizare obligatorie;

- colectarea unei probe de sânge de la toți bolnavi cu febră și erupții cutanate în zilele 4-7 (în cazuri excepționale – până în ziua a 28-a) și a unei probe de urină până în ziua a 7-a de la debutul erupțiilor cutanate.

Un indicator de supraveghere eficientă, conform prevederilor OMS, este colectarea anual a două probe sangvine de la cazuri suspecte la rujeolă la 100.000 populație (în total 80 de probe anual pentru Republica Moldova).

În anul 2018, situația din țară privind rujeola s-a agravat. Au fost depistate 425 de cazuri suspecte la rujeolă (febră și erupții cutanate), din care 291 de cazuri au fost investigate serologic. În total, prin metode clinico-epidemiologice și metode de laborator, au fost confirmate și înregistrate 340 de cazuri de rujeolă. În cazuri necesare (tabloul clinic neclar, cazuri importate sau primele cazuri în erupție, legă-

tura epidemiologică neidentificată etc.), diagnoza clinică a fost confirmată prin investigații serologice la 56,8% din bolnavi.

Prin genotiparea tulpinilor circulante de virus rujeolic au fost detectate următoarele tipuri genetice de tulpini rujeolice: D8 Cir Somach, D8 Cambbridge, B3 Dublin și D8 MeaNS-5484, care în anii 2016-2018 circulau pe larg în majoritatea regiunilor lumii, inclusiv în țările europene (tabelul 1).

Cu ajutorul investigațiilor genetice a fost posibil de caracterizat genetic tulpinile virusului rujeolic care au provocat patru erupții din cinci înregistrate în Moldova în anul 2018 (tabelul 2).

Dintre cele 252 de cazuri din erupția cu codul MD-CG-18-01, legate în timp și loc, la șase persoane

a fost depistat virusul rujeolic de tipul 4683 D8 Gir Somnath și numai la o persoană din cele contacte (aceiași timp, loc, legături familiale) a fost identificat tipul 4283 D8 Cambridge, la fel ca și la un caz din Chișinău, la care nu au fost stabilite legături epidemiologice.

Dintre cele 11 cazuri din focarul cu codul MD-DR-18-01, legate în timp și loc, la două persoane a fost depistat genotipul virusului rujeolic 4683 D8 Gir Somnath, iar la unul din contactii direcți (timp, loc, legături familiale) a fost depistat genotipul 4299 B3 Dublin, ceea ce poate fi explicat numai prin existența altor contacte, care nu au fost evidențiate.

Tabelul 1

Caracteristica genotipurilor virusului rujeolic circulante în Republica Moldova în anul 2018

Genotipul D8 linia genetică MVs / Cambridge.GBR / 5,16 (diferență față de linia MVi / Hulu Langat.MYS / 26,11 – 1 înlocuire a nucleotidei) a fost inițial izolat în Marea Britanie în anul 2016 de la un caz de rujeolă importat din Italia. În 2016 a circulat activ în țările europene. În 2017 a circulat pe teritoriul CSI: Ucraina, Rusia. În 2018, tulpinile acestei linii genetice au circulat în Ucraina, Marea Britanie, Italia, Coreea de Sud; ocazional au fost izolate în Germania, Republica Cehă, Ungaria, Letonia, Croația, Spania, Belarus, Moldova, Polonia, Uzbekistan. În Rusia, în 2018 virusul acestei linii genetice a fost izolat în 14 teritorii.
Genotipul de linie genetică D8 MVs / Gir Somnath.IND / 42,16 , izolat pentru prima dată în India în 2016 (singura izolare în 2016). În 2017, tulpinile de această linie au fost izolate în India, Germania, Israel. În anul 2018, virusul de acest genotip a circulat activ în India, Thailanda, Japonia, Vietnam, Germania, Italia, Ucraina, Israel; focarele locale asociate cu importul virusului au fost înregistrate în Austria, Australia, Cambodgia, Belarus, Kazahstan, Marea Britanie. Episodic, virusul a fost izolat în alte țări, de obicei de la cazuri importate. În 2018, virusul acestei linii genetice a fost izolat în 27 de teritorii din Rusia.
Genotipul D8 MeaNS-5484, varianta genetică a virusului rujeolic D8 MVs/Gir Somnath.IND/42,16 (diferența – 1 nt-înlocuire) a fost izolat în Moldova în luna mai a anului 2018 și în Uzbekistan în iunie 2018.
Genotipul B3 linia genetică MVs / Dublin.IRL / 8,16 / . Linie de descendență africană, evidențiată în Irlanda în 2016. Tulpinile liniei au avut o circulație largă în mai multe țări din regiunea europeană a OMS în 2016-2018: Irlanda, Italia, România, Belgia, Franța, Marea Britanie, ocazional izolate în 2017 în Germania, Portugalia, Spania, Serbia, Elveția, Suedia, Austria, Finlanda. În anul 2018 – în Marea Britanie, România, Spania, Serbia, Rusia, Kazahstan; izolat episodic în Albania, Austria, Belgia, Bulgaria, Bosnia și Herțegovina, Croația, Ungaria, Kazahstan, Suedia, Elveția, Ucraina, Belarus, Turcia, Franța, SUA și Canada. În Federația Rusă, tulpina acestei linii a circulat în mod activ pe parcursul anilor 2017-2018 în 29 de teritorii.

Tabelul 2

Date privind erupțiile de rujeolă în Republica Moldova, provocate de diferite genotipuri ale virusului rujeolic, anul 2018

Genotipul virusului rujeolic	Codul erupției	Localități afectate	Nr. total de cazuri	Durata erupției
4283 D8 Cambridge	MD-C-18-01	Mun. Chișinău	11	03.05.18–01.06.18
5484 D8 Gir Samnath+1	MD-DR-18-01	R-I Drochia	11	16.04.18–06.06.18
4683 D8 Gir Somnath	MD-DR-18-02	R-I Drochia	10	14.05.18–08.06.18
	MD-SR-18-01	Mun. și r-I Soroca	34	21.09.18–19.12.18
	MD-CG-18-01	R-I Ceadâr-Lunga	252	18.07.18–22.09.18
		R-I Vulcănești		
		R-I Taraclia		
		R-I Ocnița		
		R-I Hâncești		
		R-I Cahul		
		R-I Ungheni		
		R-I Nisporeni		
Total: numărul erupțiilor epidemice	5	Total: numărul de cazuri cu legături stabilite	318	

Concluzii

Genotipurile virusului rujeolei circulante în țară în anul 2018 au inclus patru tipuri: D8 linia genetică MVs / Cambridge.GBR / 5,16; D8 MVs / Gir Somnath. IND / 42,16; B3 linia genetică MVs / Dublin.IRL / 8,16 / și D8 MeaNS-5484. Aceste genotipuri sunt răspândite pe larg în lume, inclusiv în țările europene și în țările limitrofe cu Republica Moldova. Depistarea de la două cazuri de rujeolă, nelegate epidemiologic, ale genotipului virusului care nu a circulat printre contactele lor evidențiate sugerează ideea că acești bolnavi au avut legături epidemiologice neevidențiate și e posibil că circulația virusului rujeolei în țară era la un nivel mai înalt decât cel înregistrat.

Bibliografie

1. Zimmerman L.A., Muscat M., Singh S. et al. Progress Toward Measles Elimination – European Region, 2009-2018. In: *Morb. Mortal Wkly Rep.*, 2019, nr. 68(17), pp. 396-401.
2. Cui A., Mao N., Wang H. et al. Importance of real-time RT-PCR to supplement the laboratory diagnosis in the measles elimination program in China. In: *PLoS One*, 2018, nr.13(11): e0208161.
3. Patel M.K., Gibson R., Cohen A. et al. Global landscape of measles and rubella surveillance. In: *Vaccine*, 2018, nr. 36(48), pp. 7385-7392.
4. Raoot A., Dewan D.K., Dubey A.P. et al. Measles Outbreak in High Risk Areas of Delhi: Epidemiological Investigation and Laboratory Confirmation. In: *Indian J. Pediatr.*, 2016, nr. 83(3), pp. 200-208.
5. den Heijer C.D., Hoebe C.J. Measles outbreak in a Dutch region with high vaccination coverage. In: *Ned. Tijdschr Geneesk.*, 2015, nr. 159: A8898.
6. Gastañaduy P.A., Banerjee E., DeBolt C. et al. Public health responses during measles outbreaks in elimination settings: Strategies and challenges. In: *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018; nr. 14(9), pp. 2222-2238.
7. Pabbaraju K., Gill K., Wong A.A. et al. Simultaneous Detection and Differentiation between Wild-Type and Vaccine Measles Viruses by a Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. In: *J. Clin. Microbiol.*, 2019, nr. 57(4).
8. Prada J.M., Metcalf C.J.E., Ferrari M.J. Improving measles incidence inference using age-structured serological data. In: *Epidemiol. Infect.*, 2018, nr. 146(13), pp. 1699-1706.
9. Benamar T., Tajounte L., Alla A. et al. Real-Time PCR for Measles Virus Detection on Clinical Specimens with Negative IgM Result in Morocco. In: *PLoS One*, 2016, nr. 11(1): e0147154.
10. Xu W., Zhang Y., Wang H. et al. Global and national laboratory networks support high quality surveillance for measles and rubella. In: *Int. Health*, 2017, nr. 9(3), pp. 184-189.
11. Gómez-Camarasa C., Lara-Oya A., Cobo F. et al. Comparison of two chemiluminescent immunoassays in the detection of measles IgM antibodies. In: *J. Virol. Methods*, 2016, nr. 237, pp. 38-39.
12. Hachette T.F., Scholz H., Bolotin S. et al. Calibration and Evaluation of Quantitative Antibody Titers for Measles Virus by Using the BioPlex 2200. In: *Clin. Vaccine Immunol.*, 2017, nr. 24(1).
13. Ma R., Lu L., Suo L. et al. Evaluation of the adequacy of measles laboratory diagnostic tests in the era of accelerating measles elimination in Beijing, China. In: *Vaccine*, 2019, May 29. pii: S0264-410X(19)30695-4
14. Watanabe A., Shimada T., Takahashi T. et al. Correlates of laboratory-confirmed measles in Japan, 2011-2015. In: *Vaccine*, 2019, nr. 37(13), pp. 1756-1762.
15. Cui A., Mao N., Wang H. et al. Importance of real-time RT-PCR to supplement the laboratory diagnosis in the measles elimination program in China. In: *PLoS One*, 2018, nr. 13(11): e0208161.
16. *Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei și parotiditei epidemice*, cod PS-IRV-05 INCDMI Cantacuzino, 2011. 9 p.
17. Dia N., Fall A., Ka R. et al. Epidemiology and genetic characterization of measles strains in Senegal, 2004-2013. In: *PLoS One*, 2015, nr. 10(5): e0121704.

Victoria Bucov, dr. hab. șt. med., prof. cerc.,
cercetător științific principal, ANSP,
tel.: 079261188,
e-mail: victoria.bucov@ansp.md