

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

Εργαστηριακή διερεύνηση επιδημίας ιλαράς στην Ελλάδα, 2005–2006

ΣΚΟΠΟΣ (α) Η εργαστηριακή επιβεβαίωση περιπτώσεων ιλαράς κατά την επιδημία ιλαράς στην Ελλάδα την περίοδο 2005–2006, (β) η συγκριτική μελέτη συμβατικών και μοριακών μεθόδων για τη διάγνωση της ιλαράς και (γ) η τυποποίηση των ιικών στελεχών που κυκλοφόρησαν κατά τη διάρκεια της επιδημίας. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Από το Δεκέμβριο του 2005 έως τον Ιούλιο του 2006 μελετήθηκαν συνολικά 421 κλινικά δείγματα (περιφερικού αίματος, αναπνευστικού συστήματος, ούρων και οροί αίματος) από 222 ύποπτα κρούσματα ιλαράς. Η πλειονότητα των δειγμάτων προερχόταν από τη νότια Ελλάδα, κυρίως από παιδιά οικογενειών τσιγγάνων, καθώς και νεαρούς ενήλικες και παιδιά του γενικού πληθυσμού. Η επιβεβαίωση των κρουσμάτων έγινε με ανίχνευση των ειδικών IgM αντισωμάτων έναντι του ιού της ιλαράς. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι ELISA και ανοσοφθορισμού. Για την αξιολόγηση της μεθόδου real time PCR για την ανίχνευση του ιικού RNA σε κλινικά δείγματα, ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ορολογική μέθοδος. Για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ιών ιλαράς πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Ειδικά IgM αντισώματα ανιχνεύτηκαν στο 84,5% των ορών από ύποπτα κρούσματα ιλαράς. Ο ανοσοφθορισμός και η μέθοδος ELISA για ανίχνευση ειδικών IgM αντισωμάτων παρουσίασαν παρόμοια ευαισθησία. RNA του ιού της ιλαράς ανιχνεύτηκε στο 87,9% των 272 κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν με real time RT-PCR. Η μέθοδος real time RT-PCR παρουσίασε υψηλή ευαισθησία για την επιβεβαίωση κρουσμάτων ιλαράς, με μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης του RNA του ιού σε δείγματα ούρων (93,3%) και σε δείγματα του αναπνευστικού συστήματος (92,4%). Η φυλογενετική ανάλυση των ιών ιλαράς κατέδειξε την κυκλοφορία του γονότυπου D6 από την αρχή της επιδημίας σε όλη την ελληνική επικράτεια και του γονότυπου D4 στη νότια Ελλάδα από το Μάρτιο του 2006. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Στη χώρα μας, το διάστημα 2005–2006 υπήρξε επιδημία ιλαράς με μεγάλο αριθμό κρουσμάτων, που επιβεβαιώθηκαν και εργαστηριακά με ορολογική μέθοδο. Η μέθοδος real time PCR αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη κατά την έναρξη της νόσου, όταν η ορολογική μέθοδος ήταν αρνητική. Η τυποποίηση του γονότυπου αποκάλυψε την ταυτόχρονη κυκλοφορία δύο γονότυπων ιού ιλαράς στην τελική φάση της επιδημίας.

Η ιλαρά, μια ιδιαίτερα μεταδοτική νόσος, ευθύνεται για το θάνατο περισσότερων παιδιών από οποιοδήποτε άλλο νόσημα που μπορεί να προληφθεί με εμβολιασμό στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στην Ελλάδα, η εισαγωγή του εμβολιασμού για την ιλαρά τη δεκαετία του 1970 και ακολούθως η συστηματική εφαρμογή του εμβολίου MMR από το 1989 συνέβαλαν ουσιαστικά στη μείωση

της ιλαράς τα τελευταία 25 χρόνια. Η τελευταία επιδημία ιλαράς σημειώθηκε το 1996 και έκτοτε δεν είχαν αναφερθεί κρούσματα ιλαράς στην Ελλάδα μέχρι το φθινόπωρο του 2005, οπότε εμφανίστηκαν περιπτώσεις ιλαράς αρχικά στη βόρεια Ελλάδα και ακολούθως στην υπόλοιπη χώρα μέχρι τον Ιούλιο του 2006.^{1,2}

Η ιλαρά εκδηλώνεται με συμπτώματα, όπως υψηλό

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(1):90–97
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(1):90–97

Μ. Λογοθέτη,¹
Σ. Κόκοτας,¹
Ε. Χορευτή,¹
Μ. Γιαννάκη,²
Α. Πάγκαλη,²
Β. Πόγκα,¹
Κ. Παπαδάκος,¹
Α. Κανσουζίδου,³
Γ. Σπάλα,⁴
Τ. Παναγιωτόπουλος,⁵
Θ. Γεωργακοπούλου,⁴
Δ. Σγούρας,¹
Α. Μεντής¹

¹Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Ιλαράς-Ερυθράς, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα

²Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα

³Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Νοσοκομείο Ειδικών Λοιμώξεων, Θεσσαλονίκη

⁴Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων και Πρόληψης Νοσημάτων, Αθήνα

⁵Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα

Laboratory investigation
of a measles outbreak in Greece,
2005–2006

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Γονότυπος
Ελλάδα
Επιδημία
Ιλαρά
Real time PCR

Υποβλήθηκε 6.3.2008
Εγκρίθηκε 29.5.2008

πυρετό, βήχα και εξάνθημα, που δεν είναι ειδικά για τη νόσο ή μπορεί να διαδράμει και ασυμπτωματικά.³ Για το λόγο αυτόν, η εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου είναι αναγκαία τόσο για την κλινική διάγνωση της, όσο και για την επιδημιολογική διερεύνηση εξάρσεων, που σε περιοχές με θερμό κλίμα παρατηρούνται περίπου κάθε 2-5 χρόνια.⁴ Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), για την επιβεβαίωση ύποπτου κρούσματος ιού ιλαράς απαιτείται προσδιορισμός των ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι του ιού της ιλαράς.⁴ Εκτός από τις ορολογικές και τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας του ιού ιλαράς, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και μοριακές μέθοδοι τόσο για την ανίχνευση όσο και για την τυποποίηση των ιών ιλαράς από κλινικά δείγματα. Η πρόσφατη επιδημία ιλαράς στην Ελλάδα επέτρεψε την εφαρμογή και την αξιολόγηση μοριακών μεθόδων σε κλινικά δείγματα από ύποπτα κρούσματα ιλαράς που απεστάλησαν στο εργαστήριό μας για επιβεβαίωση της νόσου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν (α) η εργαστηριακή επιβεβαίωση των κρουσμάτων ιλαράς, (β) η συγκριτική μελέτη των συμβατικών και των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Ιλαράς-Ερυθράς για την ανίχνευση του ιού ιλαράς και (γ) η τυποποίηση των ιικών στελεχών που κυκλοφόρησαν κατά τη διάρκεια της επιδημίας στη χώρα μας.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πληθυσμός μελέτης και κλινικά δείγματα

Στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Ιλαράς-Ερυθράς απεστάλησαν κλινικά δείγματα από 222 ύποπτα κρούσματα ιλαράς στο διάστημα μεταξύ Δεκεμβρίου 2005 και Ιουλίου 2006.

Η προέλευση των δειγμάτων φαίνεται στον πίνακα 1. Η κατανομή των ύποπτων κρουσμάτων για ιλαρά κατά ηλικία και προέλευση του πληθυσμού, για όσες περιπτώσεις υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία, φαίνεται στην εικόνα 1. Την πλειονότητα των περιπτώσεων ιλαράς αποτελούσαν παιδιά και νεαροί ενήλικες του γενικού πληθυσμού, καθώς και παιδιά οικογενειών τσιγγάνων.

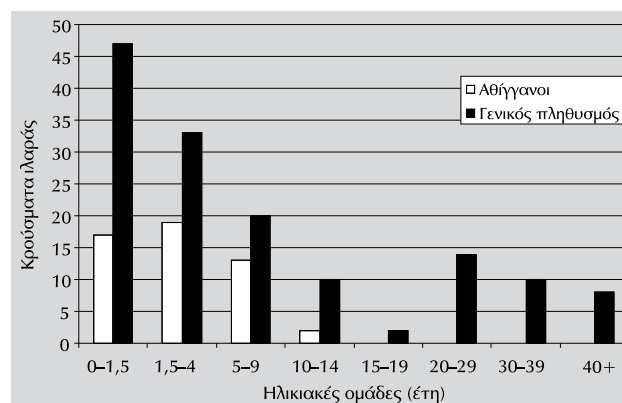
Συνολικά, παρελήφθησαν 149 οροί αίματος, 82 δείγματα αίματος με αντιπηκτικό, 45 δείγματα ούρων και 145 δείγματα από το αναπνευστικό σύστημα, δηλαδή συνολικά 421 δείγματα από τις 222 ύποπτες περιπτώσεις ιλαράς. Τα δείγματα προέρχονταν από το Δίκτυο Ιατρών Παρατηρητών Νοσηρότητας (Sentinel) του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) του Υπουργείου Υγείας και από ασθενείς νοσοκομείων και αντιστοιχούσαν στο 1/3 περίπου των κρουσμάτων ιλαράς που αναφέρθηκαν στο ΚΕΕΛΠΝΟ από το Σεπτέμβριο 2005 έως τον Ιούλιο 2006.

Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι του ιού της ιλαράς

Η ορολογική ανίχνευση των αντισωμάτων για την επιβεβαίωση

Πίνακας 1. Αριθμός ασθενών και περιοχή προέλευσης δειγμάτων που απεστάλησαν στο Κέντρο Αναφοράς Ιλαράς-Ερυθράς για ανίχνευση του ιού ιλαράς.

Περιοχή προέλευσης δειγμάτων	Αριθμός
Αθήνα	63
Αττική	117
Θεσσαλονίκη	15
Ημαθία	2
Κιλκίς	1
Σέρρες	1
Τρίκαλα	1
Καρδίτσα	3
Αιτωλοακαρνανία	5
Βοιωτία	6
Εύβοια	1
Φθιώτιδα	1
Αχαΐα	1
Ηλεία	1
Αρκαδία	1
Μεσσηνία	1
Κεφαλληνία	1
Κυκλάδες	1
Σύνολο	222



Εικόνα 1. Κατανομή κρουσμάτων ύποπτων για ιλαρά ανά ηλικία και προέλευση πληθυσμού.

των ύποπτων κρουσμάτων ιλαράς έγινε με την προτεινόμενη από τον ΠΟΥ μέθοδο αναφοράς, Enzygnost Measles IgM (Dade Behring, Germany). Συνολικά, μελετήθηκαν 149 δείγματα ορού για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι του ιού της ιλαράς. Πραγματοποιήθηκε επίσης συγκριτική μελέτη της προαναφερθείσας μεθόδου και της μεθόδου ανοσοφθορισμού IFA Anti-measles (Bios, Gräfelfing, Germany) για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι του ιού της ιλαράς, με τη χρησιμοποίηση 96 από τους

ανωτέρω ορούς από παιδιά με κλινικά επιβεβαιωμένη ιλαρά και επιπλέον 28 ορών από νοσηλευόμενα παιδιά χωρίς ιλαρά.

Ανίχνευση RNA του ιού της ιλαράς από κλινικά δείγματα με μέθοδο real time RT-PCR – αξιολόγηση της μεθόδου

Η ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού της ιλαράς πραγματοποιήθηκε σε 82 δείγματα περιφερικού αίματος (μονοπύρηνια λευκά αιμοσφαίρια, PBMCs), σε 45 δείγματα ούρων, 71 ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, 22 επιχρίσματα στοματοφάρυγγα και 52 ρινικά εκπλύματα, δηλαδή συνολικά σε 272 δείγματα. Η εκχύλιση του ιικού RNA από τα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο QIAamp Viral RNA (Qiagen, Inc).

Ακολούθως, εφαρμόστηκε real time RT-PCR ενός σταδίου, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη.⁵ Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν ήταν ειδικοί για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου νουκλεοπρωτεΐνης (N) του ιού. Το προϊόν πολλαπλασιασμού μεγέθους 413 bp ανιχνεύτηκε με δύο ιχνηθέτες υβριδισμού τεχνολογίας FRET στη συσκευή Light Cycler (Roche).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε RNA στέλεχος μονοδύναμου εμβολίου της ιλαράς, γονότυπου A.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου real time RT-PCR αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της ορολογικής μεθόδου προσδιορισμού IgM αντισωμάτων έναντι του ιού της ιλαράς, που θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την εργαστηριακή επιβεβαίωση κρουσμάτων ιλαράς.⁴

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ασθενείς για τους οποίους ήταν γνωστά τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου και επιπλέον υπήρχε διαθέσιμο τουλάχιστον ένα κλινικό δείγμα προερχόμενο από την αναπνευστική οδό, το αίμα ή τα ούρα για ανίχνευση του RNA του ιού της ιλαράς.

Η ειδικότητα της real time RT-PCR ελέγχθηκε επιπλέον σε δείγματα ασθενών θετικά για άλλους ιούς, εκτός της ιλαράς. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 14 δείγματα ούρων και 8 αίματος θετικά για κυτταρομεγαλοϊό και 25 φαρυγγικά επιχρίσματα, από τα οποία 12 ήταν θετικά για ιούς γρίπης Α ή Β, 7 για αναπνευστικό συγκυτιακό ιό, 3 για ιό παραγρίπης και 3 για μεταπνευμοϊό.

Τυποποίηση ιών ιλαράς με αλληλούχηση – Φυλογένεση

Για την τυποποίηση των ιών ιλαράς επιλέχθηκαν 34 δείγματα θετικά για τον ιό ιλαράς με real time RT-PCR. Κριτήρια επιλογής ήταν η όσο το δυνατόν ευρύτερη γεωγραφική διασπορά των πηγών προέλευσης και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου από τεχνική άποψη.

Αναλυτικά, τα 24 δείγματα προέρχονταν από περιπτώσεις ιλαράς στη νότια Ελλάδα και, συγκεκριμένα, 2 από Βοιωτία, 14 από Αθήνα, 6 από Αττική, ένα από Αρκαδία και ένα από Ηλεία, ενώ τα υπόλοιπα 10 από τη βόρεια Ελλάδα, δηλαδή ένα από Σέρρες, 6 από Θεσσαλονίκη, 2 από Ημαθία και ένα από Τρίκαλα. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος 589 βάσεων του 3'

άκρου του γονιδίου N του ιού της ιλαράς με μέθοδο PCR, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.⁶

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αμφίδρομη ανάγνωση της αλληλουχίας του πολλαπλασιασμένου τμήματος με τη χρήση του GenomeLab DTCS-Quick Start Kit, Beckman Coulter, USA, στο γενετικό αναλυτή CEQ™ 8000, Beckman Coulter, USA. Η ευθυγράμμιση και των 34 αλληλουχιών με πρότυπα στελέχη πραγματοποιήθηκε με το ClustalX.⁷

Τέλος, η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μοντέλου Kimura 2-parameter model (λογισμικό Mega v2.1).⁸

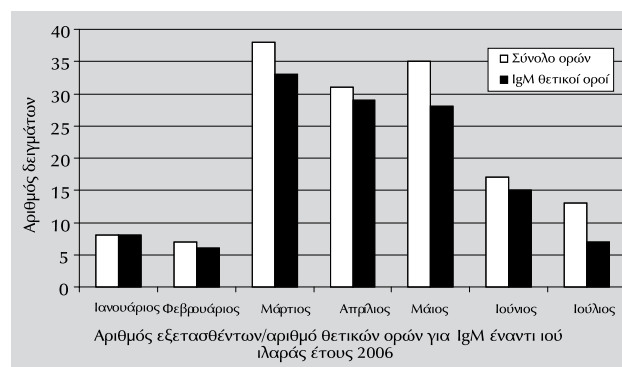
Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fisher's exact.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ειδικά αντισώματα IgM έναντι του ιού της ιλαράς και συγκριτική μελέτη μεθόδων προσδιορισμού τους

Το σύνολο των ορών που ελέγχθηκαν και ο αριθμός των θετικών δειγμάτων ανά μήνα φαίνονται στην εικόνα 2. Με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, στους 149 εξετασθέντες ορούς από ύποπτα κρούσματα ιλαράς βρέθηκαν 126 θετικοί (ποσοστό 84,5%), επιβεβαιώνοντας την κλινική διάγνωση, και 23 αρνητικοί (15,5%). Περαιτέρω διερεύνηση των περιπτώσεων με αρνητικά αποτελέσματα για παρουσία αντισωμάτων IgM έδειξε ότι σε 6 περιπτώσεις και η μέθοδος real time PCR ήταν αρνητική σε δείγματα από τους ασθενείς αυτούς, σε 2 περιπτώσεις η εξέταση πραγματοποιήθηκε λόγω ύπαρξης κρούσματος ιλαράς στο άμεσο οικογενειακό περιβάλλον, ενώ για 4 περιπτώσεις δεν υπήρχαν δεδομένα. Τέλος, σε 11 περιπτώσεις οι οροί είχαν ληφθεί εντός των 3 πρώτων ημερών από την εμφάνιση του εξανθήματος.



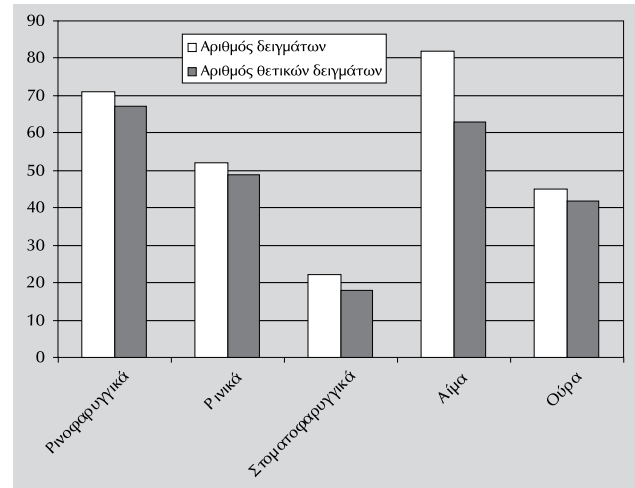
Εικόνα 2. Αποτελέσματα αναζήτησης IgM αντισωμάτων έναντι του ιού της ιλαράς σε δείγματα ορού.

Τα αποτελέσματα της συγκριτικής μελέτης της ανοσοενζυμικής μεθόδου Enzygnost και της μεθόδου ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό των ειδικών IgM αντισωμάτων παρατίθενται στον πίνακα 2. Η μέθοδος ανοσοφθορισμού παρουσιάζει ελαφρά μεγαλύτερη ευαισθησία από την ανοσοενζυμική μέθοδο (94,8% έναντι 92,7%), αν και η μεταξύ τους διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Ανίχνευση RNA ιού της ιλαράς από κλινικά δείγματα με real time RT-PCR – αξιολόγηση της μεθόδου

RNA ιού της ιλαράς ανιχνεύτηκε σε 239 δείγματα από το σύνολο των 272 κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν (ποσοστό 87,9%). Τα αποτελέσματα της real time RT-PCR ανά τύπο εξετασθέντος δείγματος φαίνονται αναλυτικά στην εικόνα 3. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης του ιού της ιλαράς παρατηρήθηκε στα δείγματα από τα ούρα και το αναπνευστικό σύστημα, 93,3% και 92,4% αντίστοιχα, ενώ στο αίμα το ποσοστό ήταν σημαντικά χαμηλότερο (76,8%).

Μεταξύ των δειγμάτων του αναπνευστικού, ο ιός ανιχνεύτηκε στα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα και τα ρινικά



Εικόνα 3. Αποτελέσματα από την ανίχνευση του RNA του ιού της ιλαράς με real time RT-PCR ανά τύπο δείγματος.

εκπλύματα σε μεγαλύτερο ποσοστό (94%), σε σχέση με τα δείγματα από το στοματοφάρυγγα (81,8%). Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της

Πίνακας 2. Συγκριτικά αποτελέσματα μεθόδου ELISA και ανοσοφθορισμού (IF) για τον προσδιορισμό των ειδικών IgM αντισωμάτων έναντι του ιού της ιλαράς σε παιδιά με ιλαρά (n=96) καθώς και σε αρνητικούς μάρτυρες (n=28).

Μέθοδος	Αποτέλεσμα	Παιδιά με ιλαρά	Παιδιά χωρίς ιλαρά	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Προγνωστική αξία	
						Θετική	Αρνητική
% (Όρια εμπιστοσύνης %)							
ELISA	IgM (+)	89	0	92,7 (85,5–97)	100 (87,7–100)	100 (95,9–100)	80 (63–91,5)
	IgM (-)	7	28				
IF	IgM (+)	91	0	94,8 (88,3–98,3)	100 (87,6–100)	100 (96–100)	84,8 (68,1–94,9)
	IgM (-)	5	28				

Πίνακας 3. Συγκριτικά αποτελέσματα ορολογικής μεθόδου και real time RT-PCR.

Είδος δείγματος	Real time RT-PCR	IgM (+)	IgM (-)	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Προγνωστική αξία	
						Θετική	Αρνητική
% (Όρια εμπιστοσύνης %)							
Αναπνευστικό	Θετικό	70	8	98,6 (92,4–99,9)	42,9 (17,7–71,1)	89,7 (80,8–95,5)	85,7 (42,1–99,6)
	Αρνητικό	1	6				
Αίμα	Θετικό	38	7	84,4 (70,6–93,5)	41,7 (15,2–72,3)	84,4 (70,6–93,5)	41,7 (15,1–72,3)
	Αρνητικό	7	5				
Ούρα	Θετικό	29	2	(*)	(*)	(*)	(*)
	Αρνητικό	0	0				
Σύνολο δειγμάτων	Θετικό	137	17	94,5 (89,4–97,6)	39,3 (21,5–59,4)	89 (82,9–93,4)	57,9 (33,5–79,8)
	Αρνητικό	8	11				

(*): Αδύνατος ο προσδιορισμός

μεθόδου real time RT-PCR σε δείγματα του αναπνευστικού, του αίματος και των ούρων συγχρόνως με τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού IgM αντισωμάτων. Η real time RT-PCR και η ορολογική μέθοδος ήταν ταυτόχρονα θετικές σε 137 και αρνητικές σε 11 ασθενείς, αντίστοιχα (συμφωνία 85,5%). Επιπλέον, σε 17 ασθενείς η real time RT-PCR μέθοδος ήταν θετική σε ένα τουλάχιστον δείγμα και η ορολογική μέθοδος αρνητική, ενώ σε 8 περιπτώσεις, παρά την παρουσία IgM αντισωμάτων, ο έλεγχος για ιό ιλαράς απέβη αρνητικός με real time RT-PCR. Στο σύνολο των 173 ασθενών, η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου real time RT-PCR σε σχέση με την ορολογική μέθοδο προσδιορισμού των IgM αντισωμάτων, η οποία θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την επιβεβαίωση ενός ύποπτου κρούσματος, ήταν 94%, 39%, 89% και 58%, αντίστοιχα.

Τέλος, σε καμιά περίπτωση από τα δείγματα ασθενών που ήταν θετικά για άλλους –εκτός της ιλαράς– ιούς δεν υπήρξε θετικό αποτέλεσμα με real time RT-PCR για ανίχνευση RNA του ιού της ιλαράς.

Τυποποίηση ιών ιλαράς

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης και η αξιολόγηση

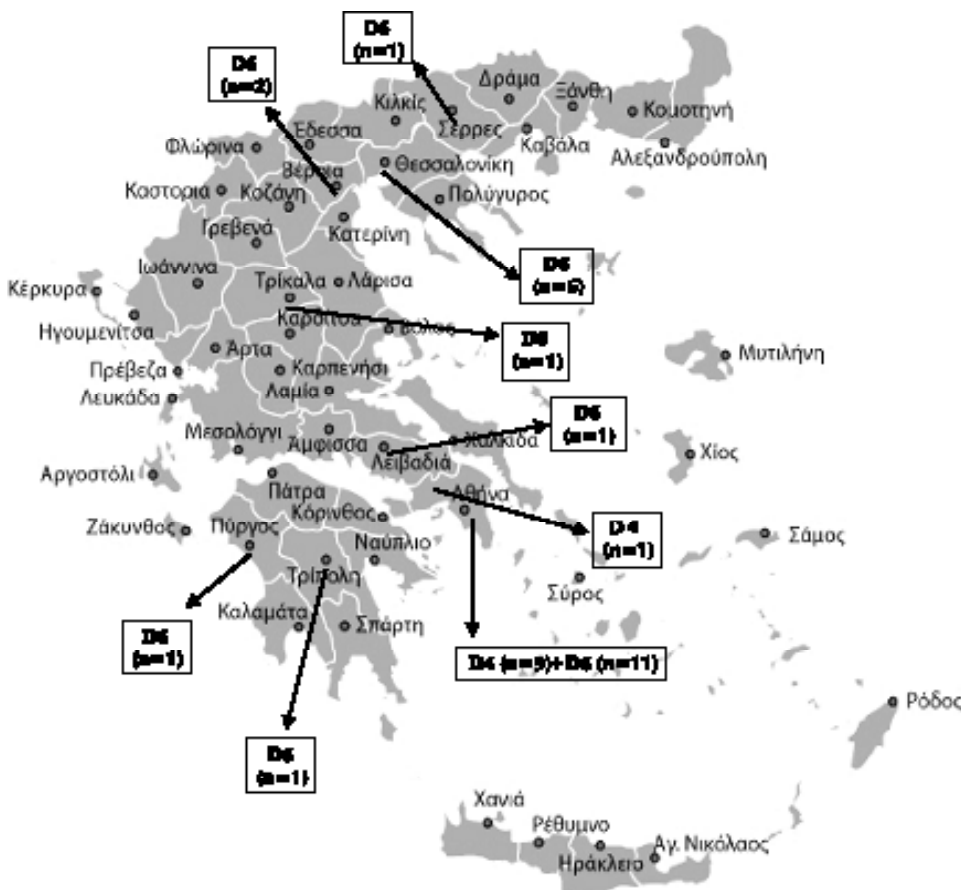
των φυλογενετικών δένδρων (στοιχεία δεν παρατίθενται) για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ιών της ιλαράς που κυκλοφόρησαν στην Ελλάδα την περίοδο 2005–2006 έδειξαν την ύπαρξη των γονοτύπων D6 και D4 του ιού.

Τα στελέχη D6 ανήκαν κυρίως στην ομάδα D6-2000, αλλά υπήρχαν και περιπτώσεις στελεχών που ανήκαν σε δεύτερη ποικιλία της ομάδας D6. Τα στελέχη του γονότυπου D4 προσομοίαζαν με τα στελέχη της ομάδας 3 του D4. Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται η γεωγραφική εξάπλωση των γονοτύπων του ιού της ιλαράς στην Ελλάδα κατά την προαναφερόμενη περίοδο.

Ο γονότυπος D6 κυκλοφόρησε από την αρχή μέχρι και το τέλος της επιδημικής περιόδου, τόσο στη βόρεια όσο και στη νότια Ελλάδα, ενώ ο γονότυπος D4 κυκλοφόρησε από το Μάρτιο έως και τον Ιούνιο 2006 και μόνο στη νότια Ελλάδα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία αναφέρονται τα αποτελέσματα της εργαστηριακής μελέτης της πρόσφατης επιδημίας ιλαράς που παρατηρήθηκε στη χώρα μας από το φθινόπωρο 2005 έως τον Ιούλιο 2006. Για την εργαστηριακή διερεύ-



Εικόνα 4. Γεωγραφική εξάπλωση των γονοτύπων του ιού της ιλαράς στην Ελλάδα την περίοδο 2005–2006.

νηση της επιδημίας χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι κλασικές μέθοδοι που προτείνονται από τον ΠΟΥ, όσο και οι νέες μοριακές μέθοδοι. Οι επιδημίες, όπως η πρόσφατη επιδημία ιλαράς στην Ελλάδα, δίνουν τη δυνατότητα αξιολόγησης νέων μεθόδων, δεδομένης της ύπαρξης δειγμάτων από ασθενείς που μπορούν να συγκριθούν με δείγματα από υγιή άτομα.

Για την εργαστηριακή επιβεβαίωση των κρουσμάτων ιλαράς έγινε έλεγχος των ειδικών IgM αντισωμάτων με τη μέθοδο Enzygnost που συνιστάται από τον ΠΟΥ, η οποία ήταν πολύ αποτελεσματική, όπως αναμενόταν, στην επιβεβαίωση των κρουσμάτων της νόσου.

Από την ανάλυση των αρνητικών δειγμάτων (βλέπε αποτελέσματα) προέκυψαν 11 περιπτώσεις με ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Σε όλες όμως αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η αδυναμία επιβεβαίωσης οφείλεται στο ότι οι οροί είχαν ληφθεί εντός των 3 πρώτων ημερών από την εμφάνιση του εξανθήματος, γεγονός που δικαιολογεί την αδυναμία ανίχνευσης των ειδικών IgM αντισωμάτων.

Είναι γνωστό ότι τα ειδικά IgM αντισώματα αρχίζουν να ανιχνεύονται 4 ημέρες μετά από το εξάνθημα⁹ και για το λόγο αυτόν ο ΠΟΥ συστήνει προσδιορισμό IgM αντισωμάτων σε ορούς που έχουν ληφθεί μετά από παρέλευση τουλάχιστον 4 ημερών από την εμφάνιση του εξανθήματος.^{4,10}

Από τον παράλληλο έλεγχο 124 ορών, τόσο με την προτεινομένη από τον ΠΟΥ μέθοδο αναφοράς Enzygnost όσο και με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού, διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος ανοσοφθορισμού παρουσίασε ελαφρά μεγαλύτερη ευαισθησία από την ανοσοενζυμική μέθοδο, αν και η μεταξύ τους διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επομένως, ο ανοσοφθορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την επιβεβαίωση κρουσμάτων ιλαράς. Αναμφίβολα, όμως, η ανοσοενζυμική μέθοδος παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς τη δυνατότητα αυτοματισμού και ταυτόχρονης επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου real time PCR⁵ που εφαρμόζεται στο εργαστήριό μας, θεωρήθηκαν ως «πραγματικά θετικές περιπτώσεις ιλαράς» κρούσματα με κλινική υποψία ιλαράς, τα οποία ήταν θετικά στον έλεγχο IgM ειδικών αντισωμάτων. Από τη συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων της ορολογικής μεθόδου προσδιορισμού των αντισωμάτων IgM και της real time RT-PCR, για όσες περιπτώσεις υπήρχαν διαθέσιμοι αφενός οροί και αφετέρου άλλα κλινικά δείγματα, προέκυψε συμφωνία αποτελεσμάτων των ανωτέρω μεθόδων σε ποσοστό 85,5%.

Από τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος της real time RT-PCR, τα δείγματα από το αναπνευστικό και τα ούρα παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία, γεγονός

που συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα,¹⁰ αν και στη δική μας μελέτη η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, πιθανόν λόγω του σχετικά μικρού αριθμού δειγμάτων.

Οκτώ δείγματα (7 δείγματα αίματος και ένα από το αναπνευστικό σύστημα) ήταν θετικά με την ορολογική μέθοδο και αρνητικά με την real time RT-PCR. Σε περαιτέρω διερεύνηση των περιπτώσεων δειγμάτων αίματος διαπιστώθηκε ότι σε δύο περιπτώσεις η εκχύλιση RNA του ιού έγινε από μονοπύρνα λευκά αιμοσφαίρια που είχαν απομονωθεί από ανεπαρκή ποσότητα ολικού αίματος και ότι σε συνολικά 5 από τα 7 δείγματα η real time RT-PCR ήταν θετική σε άλλο δείγμα (αναπνευστικού ή ούρων) από τους ίδιους ασθενείς.

Η χαμηλή ειδικότητα της real time RT-PCR (39%), όπως προκύπτει από τη σύγκρισή της με την ορολογική μέθοδο, αποδίδεται στην εξέταση με ορολογική μέθοδο ορών από ύποπτα κρούσματα ιλαράς που είχαν ληφθεί εντός 3 ημερών από την έναρξη του εξανθήματος. Δεδομένου ότι η ανίχνευση γενετικού υλικού με μοριακές μεθόδους συμπίπτει με την έναρξη της νόσου, όταν τα IgM αντισώματα δεν μπορούν ακόμη να ανιχνευθούν,¹¹ είναι αναμενόμενο όταν τα δείγματα έχουν ληφθεί εντός των πρώτων 3 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων ιλαράς να ανιχνεύεται ιικό RNA, ενώ η ορολογική εξέταση να αποβαίνει αρνητική.

Η παρουσία επιμολύνσεων της μοριακής μεθόδου δεν φαίνεται πιθανή λόγω των μέτρων που λαμβάνονται στα εργαστήριά μας για την αποφυγή του προβλήματος αυτού. Επιπλέον, η ειδικότητα της μεθόδου real time RT-PCR ελέγχθηκε με κλινικά δείγματα που ήταν θετικά για άλλους ιούς και στα οποία η μέθοδος ήταν αρνητική σε όλες τις περιπτώσεις.

Συνολικά, διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος real time PCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση του ιικού RNA από κλινικά δείγματα ακόμη και στην αρχή της νόσου, όταν η ορολογική μέθοδος είναι ακόμη αρνητική.

Από τη φυλογενετική ανάλυση προέκυψε η ύπαρξη δύο διαφορετικών γονοτύπων, του D6 και του D4, του ιού της ιλαράς κατά τη διάρκεια της επιδημίας που καταγράφηκε στην Ελλάδα την περίοδο 2005–2006. Όλα τα δείγματα που προέρχονταν από τη βόρεια Ελλάδα κατατάχθηκαν στον τύπο D6, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενη δημοσίευση.¹ Όλα τα στελέχη του τύπου D4 απομονώθηκαν από περιστατικά ιλαράς στη νότια Ελλάδα. Αν και δεν είναι γνωστή η προέλευση του στελέχους D4 στην Ελλάδα, φαίνεται ότι ο ιός από την Ελλάδα εξαπλώθηκε περαιτέρω στην Αλβανία και από εκεί στη Γερμανία.¹²

Παρά το γεγονός ότι η επίπτωση της ιλαράς έχει μειωθεί σημαντικά με την καθιέρωση του συστηματικού

εμβολιασμού σε αναπτυσσόμενες χώρες, εντούτοις η ύπαρξη θυλάκων με χαμηλή ανοσολογική κάλυψη έναντι του ιού της ιλαράς μπορεί να οδηγήσει σε εξάρσεις ιλαράς σε ανεμβολίαστα ή ανεπαρκώς (με μία δόση) εμβολιασμένα άτομα. Μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα έχουν δείξει υψηλή εμβολιαστική κάλυψη των παιδιών με μία δόση εμβολίου τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και στους μετανάστες, αλλά λιγότερο ικανοποιητική κάλυψη με δύο δόσεις. Ειδικότερα, μελέτη που έγινε το 2006 από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) και το Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού σε πανελλαδικό δείγμα παιδιών Α΄ Δημοτικού (n=3.878) έδειξε ότι 99% των παιδιών είχαν εμβολιαστεί με μία δόση και 77% με δύο δόσεις εμβολίου για ιλαρά (αδημοσίευτα στοιχεία). Ωστόσο, όπως έδειξε η ίδια μελέτη, υπάρχει σημαντικό πρόβλημα στην εμβολιαστική κάλυψη των παιδιών τσιγγάνικης καταγωγής, δεδομένου ότι μόνο ποσοστό 2–12% έχει εμβολιαστεί, σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη τη χρονική περίοδο 2003–2005.²

Επίσης, ανεπαρκώς εμβολιασμένοι είναι οι σημερινοί νέοι ενήλικοι, καθώς στις παλαιότερες γενιές η κάλυψη ήταν

χαμηλότερη. Έτσι, με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα του ΚΕΕΛΠΝΟ, η επιδημία ιλαράς που σημειώθηκε στην Ελλάδα το διάστημα 2005–2006 έπληξε περισσότερο παιδιά τσιγγάνικης καταγωγής και νέους ενήλικες του γενικού πληθυσμού.² Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόμοιες επιδημικές εξάρσεις καταγράφηκαν την ίδια περίπου χρονική περίοδο και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, γεγονός που σε συνδυασμό με τη μετανάστευση των πληθυσμών μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της κυκλοφορίας του ιού της ιλαράς και της διασποράς του.

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την αναγκαιότητα του συστηματικού εμβολιασμού, αλλά και τη σπουδαιότητα της εργαστηριακής επιτήρησης, με σκοπό την έγκαιρη και την έγκυρη διάγνωση ύποπτων κρουσμάτων ιλαράς. Επίσης, η ταυτόχρονη παρουσία των γονοτύπων D4 και D6 υπογραμμίζει την αναγκαιότητα εργαστηριακής διερεύνησης των επιδημιών με φυλογενετική ανάλυση των ιών, που διευκολύνει την προσπάθεια προσδιορισμού της πηγής διασποράς και ως εκ τούτου τη λήψη μέτρων ελέγχου της επιδημίας.

ABSTRACT

Laboratory investigation of a measles outbreak in Greece, 2005–2006

M. LOGOTHETI,¹ S. KOKOTAS,¹ E. HOREFTI,¹ M. GIANNAKI,² A. PAGALI,² V. POGA,¹ K. PAPADAKOS,¹ A. KANSOUZIDOU,³ G. SPALA,⁴ T. PANAYIOTOPOULOS,⁵ T. GEORGAKOPOULOU,⁴ D. SGOURAS,¹ A. MENTIS¹

¹National Reference Laboratory for Measles & Rubella, Hellenic Pasteur Institute, Athens, ²Department of Microbiology, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, ³Laboratory of Clinical Microbiology, Infectious Diseases Hospital, Thessaloniki, ⁴Hellenic Center for Control and Prevention of Diseases, Athens, ⁵National School of Public Health, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(1):90–97

OBJECTIVES (a) Laboratory confirmation of cases suspicious for measles during the 2005–2006 measles outbreak in Greece, (b) comparative evaluation of conventional and molecular methods for measles diagnosis, and (c) molecular characterization of measles virus (MV) strains. **METHOD** A total of 421 clinical specimens, specifically peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), respiratory exudate, urine and serum derived from 222 suspected measles cases were received between December 2005 and July 2006. The majority of the specimens were collected from Roma children and young adults and children of the general population in southern Greece. Measles cases were confirmed by MV-specific IgM antibodies determination by ELISA and immunofluorescence (IF) assays. Serology was considered as the "gold standard" for the evaluation of an in house real time RT-PCR for the MV RNA detection. Measles virus genotyping was carried out by partial sequencing and phylogenetic analysis of the MV nucleoprotein gene. **RESULTS** MV specific IgM antibodies were detected in 84.5% of patients. IF and ELISA were equally sensitive in the detection of specific IgM antibodies. MV RNA was detected in 87.9% of the 272 samples tested by real time PCR, with a higher detection rate observed in urine (93.3%), and respiratory samples (92.4%). Phylogenetic analysis revealed the circulation of MV D6 genotype in the wider region of Greece during the outbreak, while the D4 genotype was detected only after March 2006, exclusively in specimens from southern Greece. **CONCLUSIONS** An outbreak of measles took place in Greece during the period of 2005–2006, with a considerable number of laboratory confirmed cases. Molecular methods are a useful alternative to serology for measles confirmation in the early stages of measles, when se-

rological tests are negative. Molecular genotyping revealed the co-circulation of two distinct MV genotypes at the end of the outbreak.

Key words: Genotype, Greece, Measles, Outbreak, Real time PCR

Βιβλιογραφία

1. GIOULA G, PAPA A, EXINDARI M, MELIDOU A, CHATZIDIMITRIOU D, KARABAXOGLOU D ET AL. Greek measles epidemic strain, 2005–2006. *Epidemiol Infect* 2007, 35:570–573
2. GEORGAKOPOULOU T, GRYLLI C, KALAMARA E, KATERELOS P, SPALA G, PANAGIOTOPOULOS T. Current measles outbreak in Greece. *Euro Surveill* 2006, 11:70–71
3. VAN BINNENDIJK RS, VAN DEN HOF S, VAN DEN KERKHOFF H, KOHL RH, WOONINK F, BERBERS GA ET AL. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in the Netherlands. *J Infect Dis* 2003, 188:898–903
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Geneva, 2006
5. SCHALK JA, DEVRIES CG, JONGEN PM. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. *Biologicals* 2005, 33:71–79
6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Standard protocols for RT-PCR for molecular epidemiology, 1995
7. THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:4876–4882
8. KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980, 16:111–120
9. TIPPLES GA, HAMKAR R, MOHKTARI-AZAD T, GRAY M, PARKYN G, HEAD C ET AL. Assessment of immunoglobulin M enzyme immunoassays for diagnosis of measles. *J Clin Microbiol* 2003, 41:4790–4792
10. MOSQUERA MM, DE ORY F, GALLARDO V, CUENCA L, MORALES M, SANCHEZ-YEDRA W ET AL. Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain. *J Clin Microbiol* 2005, 43:5117–5121
11. RIDDELL MA, CHIBO D, KELLY HA, CATTON MG, BIRCH CJ. Investigation of optimal specimen type and sampling time for detection of measles virus RNA during a measles epidemic. *J Clin Microbiol* 2001, 39:375–376
12. KREMER JR, BROWN KE, JIN L, SANTIBANEZ S, SHULGA SV, ABOUDY Y ET AL. High genetic diversity of measles virus in the WHO European region, 2005–2006. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:107–114

Corresponding author:

A. Mentis, Institut Pasteur Hellenique, 127 Vas. Sofias Ave., GR-115 21 Athens, Greece
e-mail: mentis@pasteur.gr