



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE  
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE  
„CANTACUZINO”

Splaiul Independenței 103, București, 050096

**Infectii Respiratorii Virale**

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

## Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice

**Cod : PS-IRV-05**

**Editia : 1**

**Revizia : 0**

**Data aplicării : 20.12.2011**

**Avertisment** Documentul de fata este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »  
Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»  
Copiile sunt numerotate si controlate.

Exemplar nr : \_\_\_\_\_

Destinatarul: \_\_\_\_\_

Exemplar :  controlat  necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

Rujeola, rubeola și parotidita epidemică sunt boli prevenibile prin vaccinare. Agenții cauzali ai acestor boli transmisibile fiind relativ stabili genetic și singura gazdă naturală fiind omul, ar putea fi eliminate și apoi eradicate. Planul OMS de eliminare a rujeolei și rubeolei până în 2015 în statele europene se bazează pe o acoperire vaccinală înaltă (peste 95%) și pe confirmarea cu laboratorul a fiecărui caz. Deoarece în toate statele europene se folosește ROR (**R**ujeola, **O**reion, **R**ubeola) în programele de imunizare, parotidita epidemică va putea beneficia indirect de un astfel de efort.

Vaccinarea antirujeolică a fost introdusă în România la sfârșitul anilor '70 iar în 2004 s-a introdus vaccinarea cu trivaccinul ROR. Supravegherea rujeolei, rubeolei și a infecției rubeolice congenitale se derulează conform metodologiilor de supraveghere, elaborată de INSP.

([http://www.insp.gov.ro/cnscbt/index.php?option=com\\_docman&task=cat\\_view&gid=39&Itemid=10](http://www.insp.gov.ro/cnscbt/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=39&Itemid=10). [http://www.insp.gov.ro/cnscbt/index.php?option=com\\_docman&Itemid=46](http://www.insp.gov.ro/cnscbt/index.php?option=com_docman&Itemid=46)).

**Obiectivul** acestui ghid este de a aduce informații suplimentare de supraveghere cu laboratorul a rujeolei și rubeolei, bazându-se în principal pe două documente OMS:

- Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region ([http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0018/79020/E93035.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0018/79020/E93035.pdf)) și
- Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection ([http://www.who.int/immunization\\_monitoring/LabManualFinal.pdf](http://www.who.int/immunization_monitoring/LabManualFinal.pdf)).

Ghidul acordă atenție specială importanței diagnosticului molecular al rujeolei, rubeolei și parotiditei epidemice precum și diagnosticul rubeolei în sarcină – tehnici care sunt **disponibile în laboratorul nostru**.

Tehnicile de epidemiologie moleculară trebuie să fie folosite în conjuncție cu tehnicile epidemiologice standard și reprezintă un instrument important pentru:

- Definirea distribuției geografice a genotipului de virus rujeolic, rubeolic, urlian
- Monitorizarea transmiterii virusului în timpul și după epidemie/ focar/ cluster
- Detectarea interupției circulației virale indigene
- Monitorizarea eficienței strategiilor de vaccinare
- Confirmarea reacțiilor vaccinale suspectate prin diferențierea tulpinii vaccinale de tulpina sălbatică

**Supravegherea moleculară** este o componentă importantă pentru monitorizarea transmiterii rujeolei și rubeolei în cadrul unei arii geografice. Unul din indicatorii de eliminare este verificarea absenței circulației endemice a rujeolei pentru cel puțin 1 an. Epidemiologia moleculară compară secvențe de diferite tulpini virale pentru a identifica originea acestora – autohtonă sau de import.

Primele *genotipări ale virusul rujeolic* pe care le-am efectuat datează din epidemia cu debut în 2005, genotip D4 și au fost efectuate în Institutul nostru. În 2008 au fost numai cazuri de import – genotip D4 și D5, în 2009 D4 import iar din august 2010 – genotip D4 dar și B3 în 2011, de origine necunoscută.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

Cât privește *virusul rubeolic*, datele pentru România sunt limitate și avem o mare nevoie de colectare de probe cu scopul de a identifica genotipul viral. Doar în epidemia din 2003 a fost cunoscut genotipul – E1.

Următoarele probe clinice pot fi colectate pentru izolarea/dectia virusului rujeolic/rubeolic/urlian:

- exsudat faringian;
- fluid oral;
- Urină

Dectia acidului ribonucleic (ARN) este efectuată în urma extractiei din probele biologice utilizând reacția de polimerizare în lant (RT-PCR) cu eficiență maximă de dectie în primele zile de la debut până la maxim 7 zile după erupție.

**1. Diagnosticul de laborator al rujeolei** se bazează pe dectia anticorpilor specifici serici. Imunoglobulinele M (IgM) și imunoglobulinele G (IgG) specifice rujeolei, sunt produse în timpul răspunsului imun primar consecutiv infecției rujeolice și pot fi dectate în ser ulterior erupției, cu ajutorul reacției ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

**Dectia anticorpilor IgM specifici rujeolei**

- între a 3-a și a 28-a zi de la apariția erupției;
- nivelul maxim: după 7-10 zile post-erupție;
- după 6-8 săptămâni nivelul scade, fiind greu de dectat.

**Dectia anticorpilor IgG specifici rujeolei:** nivelul maxim este atins la trei săptămâni și persistă mult timp după infecție. Reexpunerea la virusul rujeolic induce un puternic răspuns imun anamnestic, stimularea rapidă a anticorpilor IgG prevenind apariția simptomelor clinice. Creșterea semnificativă a anticorpilor IgG în seruri perechi confirmă infecția rujeolică.

**Panencefalita sclerozantă subacută (PESS)** este o boală degenerativă rară, tardivă. Reprezintă o afecțiune progresivă, de obicei fatală, care apare cel mai frecvent la 6-8 ani de la infecția rujeolică inițială. Atât în LCR (lichid cefalorahidian), cât și în ser se înregistrează titruri ridicate de anticorpi anti-virus rujeolic.

**2. Diagnosticul de laborator al rubeolei**

Mai multe infecții pot avea semne și simptome comparabile cu rubeola. Mai mult de 50% dintre persoanele infectate au simptome clinice minime sau absente, de aceea laboratorul joacă un rol critic în confirmarea diagnosticului.

**Dectia anticorpilor IgM specifici rubeolei.**

- sunt dectati la 3-4 zile după debut, dar pot fi dectati și la 2 luni după infecție, iar la unii pacienți chiar până la 6 luni postinfecție naturală, vaccinare sau reinfecție.
- reacții fals pozitive la testul de dectie a anticorpilor IgM pot fi datorate crossreactivității anticorpilor IgM (la virusul Epstein Barr, parvovirus B19, etc), factor reumatoid.

**Dectia anticorpilor IgG specifici rubeolei:**

- pot fi dectati la aproximativ 7 zile după erupție.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

- în urma vaccinării apariția IgG și IgM este ușor întârziată, iar vârful nivelului de anticorpi este mai scăzut comparativ cu infecția naturală.

### ***Rubeola în sarcină***

Rubeola dobândită în primele 11 săptămâni de sarcină este asociată cu un risc înalt (70-90%) de apariție a sindromului rubeolic congenital (SRC). SRC este întâlnit la 0.6-2.2 din 1000 copii născuți vii pe durata epidemiilor în țările fără programe de imunizare. Avortul spontan sau copil născut mort mai pot fi întâlnite ca urmare a infecției în primul trimestru de sarcină.

Infecția rubeolică aparută în intervalul dintre săptămânile 11-17 de sarcină poate avea ca efect o singură anomalie, defecte de auz.

Defecte sunt rar întâlnite la copiii ale caror mame au contactat virusul după săptămâna 20 de gestație.

### **Conduita în screening-ul și urmărirea femeilor gravide suspecte de contact de rubeolă (Fig.1)**

Deoarece consecințele infecției rubeolice în timpul sarcinii sunt grave, trebuie să se facă eforturi pentru identificarea tuturor femeilor la vârsta de procreere expuse la o persoană cu rubeolă posibilă, probabilă sau confirmată.

Conduită:

1. Femeia găsită susceptibilă (IgG negativ) dar neînsărcinată – trebuie să fie vaccinată, ea, precum și contactii susceptibili (membrii familiei)
2. Toate femeile gravide expuse trebuie să fie testate pentru a se determina dacă:
  - a. Au fost infectate în timpul sarcinii;
  - b. Sunt susceptibile ;
  - c. Au fost imune înaintea sarcinii.

Confirmarea diagnosticului clinic cu laboratorul este esențială:

- detectia anticorpilor IgM specifici rubeolei. Un rezultat IgM pozitiv cu o valoare scăzută prezent la o femeie gravidă fără semne / simptome clinice sau contact cu un caz confirmat de rubeolă trebuie interpretat cu atenție;
- pentru a confirma diagnosticul de rubeolă în cazul unui rezultat IgM pozitiv se testează detectia anticorpilor IgG,
- dacă se confirmă prezența anticorpilor IgG specifici se impune determinarea indicelui de aviditate a anticorpilor IgG. Aviditatea crescută presupune lipsa infecției recente, iar indicele de aviditate scăzut presupune prezența infecției acute cu virus rubeolic sălbatic sau vaccinal, fapt ce ajută în luarea unei decizii medicale corecte.

### **Etape de evaluare și urmărire a femeii gravide contact cu o persoană cu rubeolă posibilă, probabilă sau confirmată:**

- detectia IgM și IgG: un IgG pozitiv indică imunitate față de rubeolă dar nu aduce nici o informație despre timpul când a avut loc infecția. Totuși, o creștere semnificativă în seruri perechi sau un IgM pozitiv indică infecție recentă.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

- Femeia gravidă cu IgG negativ și IgM negativ trebuie retestată la 10-14 zile, când cele două probe de ser trebuie analizate împreună :
  - o O creștere semnificativă în IgG sau/si un IgM pozitiv indică infecție recentă
  - o Dacă femeia gravidă susceptibilă continuă să fie expusă,
    - se repetă testarea pe seruri perechi tot la 10-14 zile, apoi la 3-4 săptămâni;
    - se evaluează noul născut pentru semne de SRC și mama se vaccinează postpartum.

În screening-ul sistematic, creșterea semnificativă a nivelului IgG, creșterea poate fi datorată:

- Infecției primare
- Vaccinării (anterioare sarcinii)
- Reinfectiei
- Stimulării nespecifice a sistemului imun.

Măsurarea indicelui de aviditate al IgG poate aduce date suplimentare, un indice de aviditate scăzut sugerând o infecție primară recentă.

***În afara epidemiei, detectia anticorpilor IgM trebuie să fie confirmați și prin alte metode, astfel ca RT-PCR și aviditate IgG.***

### **3. Rubeola congenitală**

În cazul primoinfecției în timpul sarcinii, virusul rubeolic se transmite de la gravida bolnavă la făt prin placentă putând apărea embriopatia rubeolică cu malformații grave ale embrionului, uneori incompatibile cu viața. Mai mult de 80% din nou născuți infectați congenital excretă cantități substanțiale de virus rubeolic în secrețiile nazo-faringiene și urină la naștere și 3% vor continua să elimine virusul chiar timp de 20 luni.

#### **Diagnosticul prenatal al infecției rubeolice congenitale:**

- din sângele fetal: detecție IgM – 100% specificitate, dar sensibilitate mai scăzută;
- din lichidul amniotic recoltat la  $\geq 6$  săptămâni de la debutul erupției,  $\geq 22$  săptămâni de sarcină: RT-PCR.

#### **Diagnosticul postnatal al infecției rubeolice congenitale (fig.2)**

Sugarii cu SRC care au supraviețuit perioadei neonatale pot dezvolta serioase dizabilități și un risc crescut de a prezenta întârzieri în dezvoltare, inclusiv autism, diabet tip I și tiroidită. În foarte puține cazuri a fost observată panencefalita progresivă asemănătoare panencefalitei subacute sclerozante.

Testele efectuate la sugarii cu infecție rubeolică congenitală (IRC):

- detecție anticorpi IgM - cel puțin 85% dintre sugarii cu IRC vor prezenta IgM pozitiv între 3-6 luni de viață, iar unii vor rămâne IgM pozitivi pentru 18 luni.
- dacă prima probă este negativă pentru prezenta anticorpilor IgM, iar suspiciunea de SRC există, o a doua probă de ser este recoltată și amandouă probele vor fi testate pentru depistarea anticorpilor IgM și IgG.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Functia	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

- pentru confirmarea sindromului rubeolic congenital la sugarii peste 6 luni se efectuează teste atat pentru detectia anticorpilor IgM cat si detectii seriale de anticorpi IgG la un interval de mai multe luni. Anticorpii IgG sunt detectati în 95% din cazurile suspecte de SRC între 6 -11 luni de viață înainte ca vaccinarea împotriva rubeolei sa fie efectuată.
- Detectia /izolarea virală. Toti sugarii cu infectia rubeolica congenitală și în particular cei cu sindrom rubeolic congenital pot răspândi virus până la un an, chiar mai mult.

Supravegherea în cazul SRC este o provocare deoarece sugarii cu manifestări mai puțin severe sau cei cu pierderea auzului (cel mai comun defect printre sugarii cu SRC) sunt detectati prea tarziu, iar confirmarea cu laboratorul fiind dificilă.

#### **4. Parotidita epidemică**

Parotidita epidemică produsă de virusul urlian, determină inflamarea glandelor salivare (în special glandele salivare parotide) putând afecta si pancreasul, sistemul nervos si organele genitale.

Parotidita epidemică constituie o problemă de sănătate mai ales prin complicatiile pe care le produce: meningită aseptică si encefalită, orhită si sechelele permanente care pot apărea.

Într-o primă etapă de supraveghere microbiologică recomandăm confirmarea cu laboratorul a focarelor precum si a complicatiilor prin:

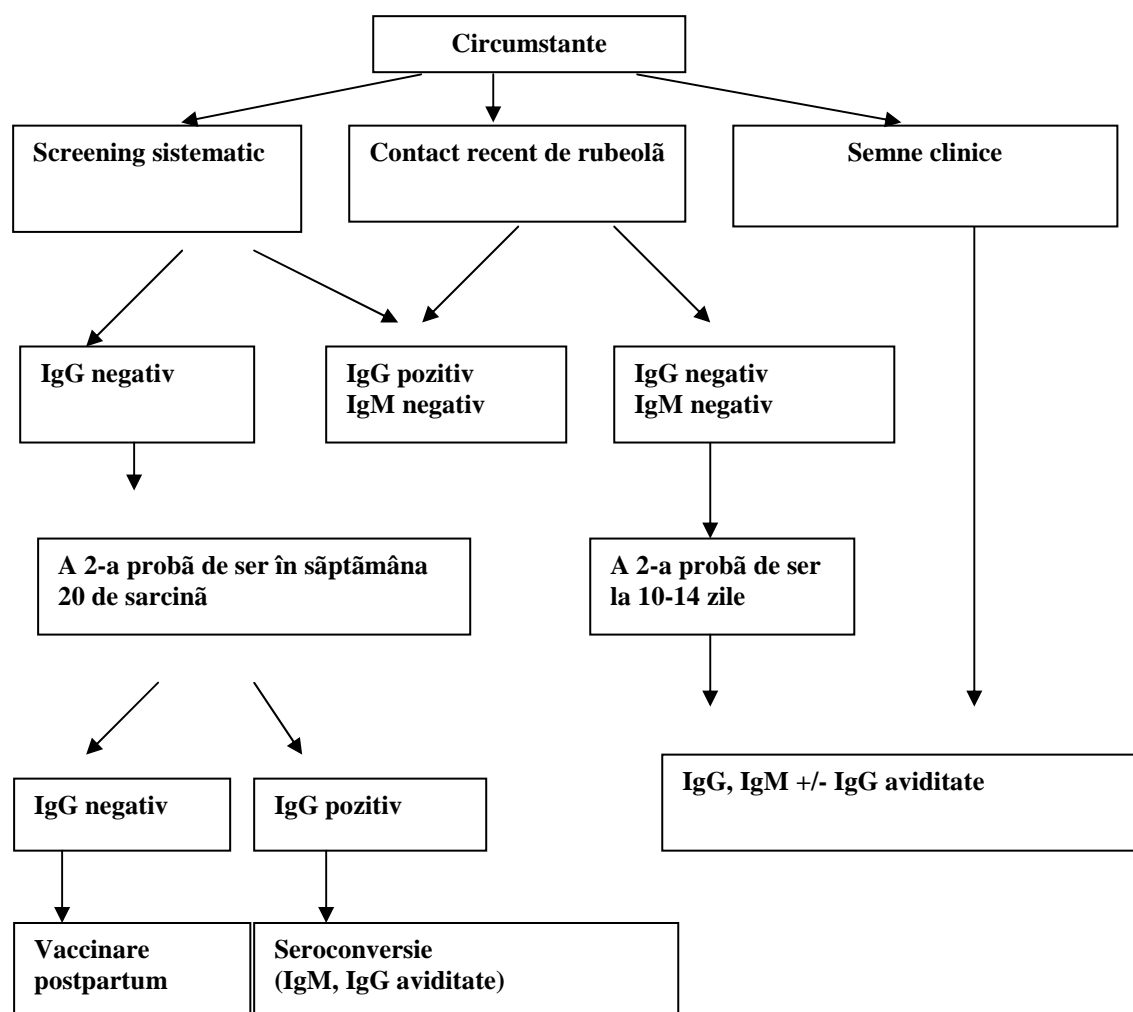
- detectia imunoglobulinelor IgM si IgG specifice
- detectia virală prin RT-PCR.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Functia	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

**Fig.1. Conduita în screening-ul și urmărirea femeilor gravide suspecte de contact de rubeolă**

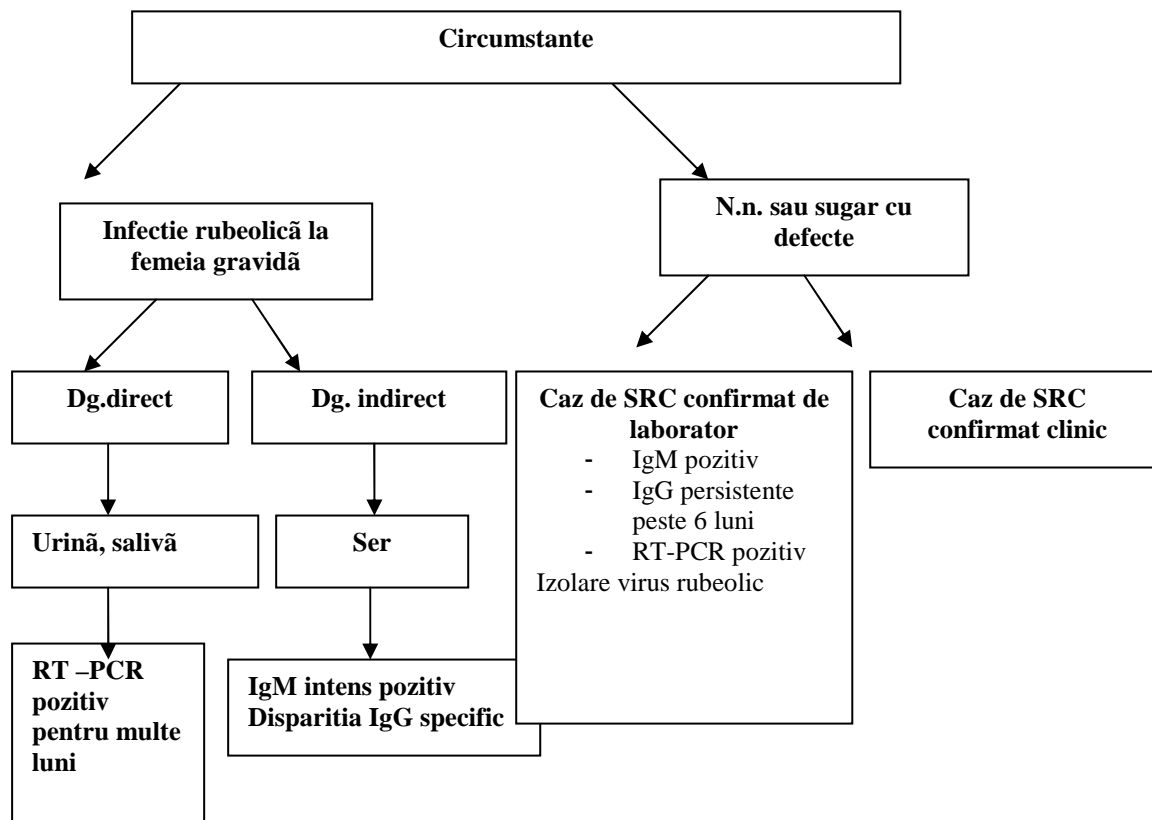


I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

**Fig. 2. Diagnosticul postnatal al infecției rubeolice congenitale:**





I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO  IRV	<b>Ghid de laborator pentru diagnosticul rujeolei, rubeolei, parotiditei epidemice</b>	Exemplar nr.
		Editia: 1
		Revizia: 0
		Data aplicării: 20.12.2011

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Functia	Responsabil analiză	Sef laborator	Sef laborator
Nume prenume	Biolog Mihaela LAZĂR	Dr.Emilia LUPULESCU	Dr.Emilia LUPULESCU
Semnatura*			
Data	20.12.2011	20.12.2011	20.12.2011

\* Semnatura se aplică pe documentul original

### **PRELEVAREA, PROCESAREA SI TRANSPORTUL PROBELOR CLINICE PENTRU DETECTIA/IZOLAREA VIRUSULUI RUJEOLIC/RUBEOLIC/URLIAN**

*Momentul recoltării:* trebuie să fie recoltate de îndată ce este posibil după debut și nu mai mult de 5 -7 zile de la debutul.

*Tehnica recoltării, stocarea și transportul probelor clinice*

Cu tampoane sterile se sterge nasofaringele și orofaringele.

Cele două tampoane se pun într-un tub ce conține 2-3 ml de mediu de transport pentru virusuri (identice cu cel pentru virus gripal, paragripal etc.)

Probele sunt transportate la I.C. ca atare, pe gheață, în maxim 24-48 ore.

Urina:

Volum: 10-50 ml/probă sunt adecvate.

Momentul recoltării: prima urină de dimineață este de preferat, în primele 7 zile de la debutul erupției.

*Tehnica recoltării, stocarea și transportul probelor de urină*

- Urina va fi recoltată într-un container steril
  - Urina va fi plasată la 4-8°C înaintea centrifugării
  - Centrifugarea se face în maxim 24 ore, la 2500 g, timp de 15', la 4 °C, se suspendă sedimentul celular în 1 ml mediu de transport viral și se transportă la I.C. pe gheață în maxim 48 ore.
- A nu se îngheța dacă transportul este posibil în 48 de ore.

Sau

- sedimentul celular reluat în 1 ml mediu de transport viral poate fi înghețat la -70 °C și transportat pe gheață

Sau

- dacă nu este posibilă centrifugarea, probele de urină sunt transportate la I.C. ca atare, în containere bine etanșate, pe gheață în maxim 24 ore.