

Wytyczne do pobierania materiału klinicznego w kierunku zakażenia ospą małą (Monkeypox virus)

1. **Podejrzanie zakażenia wirusem Monkeypox powinno być postawione na podstawie zarówno klinicznych, jak i epidemiologicznych przesłanek.** Ze względu na możliwość wystąpienia podobnych objawów (wysypka) w przebiegu wielu zakażeń, w przypadku braku informacji o ewentualnym narażeniu na zakażenie wirusem Monkeypox, wskazane jest wdrożenie co najmniej równoległej diagnostyki różnicującej w kierunku m.in.: VZV, HSV, enterowirusów, odry i in.
2. Monkeypox virus zaliczany jest do 3 kategorii bezpieczeństwa biologicznego, co oznacza, że:
 - a. Badania diagnostyczne (a przynajmniej etap inaktywacji próbki) należy prowadzić wyłącznie w warunkach podwyższonego poziomu bezpieczeństwa biologicznego (Laboratorium BSL3 lub BSL4) z zapewnieniem odpowiednich środków ochrony osobistej i środków ochrony.
 - b. Podstawową metodą diagnostyczną jest poszukiwanie swoistych sekwencji w genomie wirusa metodami biologii molekularnej np. PCR, PCR+sekwencjonowanie itp.
 - c. Ze względu na możliwe reakcje krzyżowe z innymi Orthopoxwirusami konieczne jest potwierdzenie rozpoznania w referencyjnym laboratorium.
 - d. **W celu weryfikacji rozpoznania lub diagnostyki ukierunkowanej na zakażenie wirusem Monkeypox, odpowiednio zapakowane próbki należy przestać do Zakładu Wirusologii NIZP PZH-PIB (Warszawa, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, transport na koszt zleceniodawcy). Zlecenie badania oraz dane wymienione w pkt.8 powinny znajdować się w osobnej kopercie dołączonej do opakowania zewnętrznego. Konieczny wcześniejszy kontakt z Sekretariatem: nr tel. 22 54 21 230, w celu uzgodnienia szczegółów.**
3. W celu ograniczenia ryzyka zakażenia pracowników szpitala lub laboratorium, należy traktować każdy pobrany materiał jako wysoce zakaźny.
4. Podstawowe zalecenia dotyczące materiałów klinicznych do badania diagnostycznego to:
 - a. Materiał należy pobrać z co najmniej dwóch zmian skórnych, do jednej próbówki, najlepiej z różnych miejsc na ciele. Różne typy materiałów (zmiany skórne, strupy i płyny pęcherzykowe) nie powinny być pobrane do tej samej próbówki.
 - b. **materiał ze zmian skórnych, w tym wymazy z powierzchni zmiany i/lub wysięku, łuski z więcej niż jednej zmiany lub strupy ze zmian.** Prawidłowo pobrany materiał należy umieścić w sterylnej próbówce zawierającej podłoże transportowe tzw. VTM. **Zaleca się stosowanie podłoża VTM/UTM, zawierającego m.in. zmodyfikowany płyn Hanksa, albuminę surowicy bydlęcej, glukozę, antybiotyki itp.**
 - c. Wymaz należy pobrać energicznie, aby zapewnić pobranie odpowiedniej ilości wirusowego DNA. Wymazy mogą być transportowane na sucho jeśli nie ma możliwości zastosowanie podłoża VTM/UTM

NIE NALEŻY STOSOWAĆ PODŁOŻA LIZUJĄCEGO/INAKTYWUJĄCEGO ZAWIERAJĄCEGO SOLE GUANIDYNY (stosowane do pobrań w przypadku podejrzenia SARS-CoV2), ponieważ w badaniu w kierunku MPXV z dużym prawdopodobieństwem uzyskany zostanie wynik niediagnostyczny.

- d. Dopuszcza się umieszczanie więcej niż 1 zmiany skórnej **tego samego typu** w 1 próbówce z VTM. Nie należy jednak łączyć w jednej próbówce zmian skórnych różnego typu czyli wymazu ze zmian chorobowych ze strupami czy płynami pęcherzykowymi.
- e. Pobrane próbki materiału klinicznego należy trzymać w ciemności i w odpowiedniej temperaturze (jak najszybciej zamrozić, a jeśli to niemożliwe bezzwłocznie umieścić w warunkach chłodzi 2-8°C).
- f. Inne uzupełniające materiały kliniczne to: wymaz z gardła, mocz, nasienie męskie, wymaz z odbytu/z dróg płciowych, krew pobrana na EDTA.
Większość testów komercyjnych zwalidowanych została w badaniach z zastosowaniem wymazów ze zmian skórnych, gardła oraz surowicy krwi. Z tego powodu należy rozważyć zasadność przesłania do badania innych materiałów.
- g. Zaleca się także pobranie surowicy do ewentualnych badań serologicznych potwierdzających zakażenie.

Najważniejsze informacje nt. próbek materiału klinicznego pobieranych do badania w kierunku zakażenia wirusem Monkeypox zebrano w Tabeli nr 1.

5. Próbki po pobraniu należy zamrozić jak najszybciej (w -20°C lub w niższej temperaturze) i tak mogą być przechowane/transportowane do max. 7 dni. Jeśli przechowywanie/transport dłużej niż 7 dni – konieczne mrożenie w temperaturze -70°C.
6. Transport w odpowiednim opakowaniu i warunkach:
 - a. Temperatura poniżej 0°C (najlepiej z suchym lodem)
 - b. Opakowanie składające się z 3 warstw:
 - i. opakowanie wewnętrzne: jałowe, szczelne, nietłukące, w którym znajduje się próbka
 - ii. opakowanie wtórne: sztywne, szczelne, zawierające materiał chłonny
 - iii. opakowanie zewnętrzne: sztywne, utrzymujące zimno, odpowiednio oznakowane
 - iv. wszystkie części opakowania po zamknięciu muszą zostać zdezynfekowane i dopiero wtedy pakowane w kolejną warstwę opakowania
 - v. dokumenty związane z próbką muszą znajdować się na części zewnętrznej – odpowiednio zabezpieczone
 - c. Transport lotniczy (jeśli niezbędny) – zgodnie z UN2814, klasa 6.2.
7. Wszystkie pozostałości należy traktować jako potencjalnie zakaźne i poddawać je dezynfekcji/sterylizacji zgodnie z procedurami danego laboratorium.
8. Niezbędne dane pacjenta to:
 - a. Imię i nazwisko
 - b. PESEL
 - c. Data urodzenia
 - d. Narodowość
 - e. Miejsce zamieszkania
 - f. Data pobrania próbki
 - g. Data wystąpienia pierwszych objawów
 - h. Data wystąpienia wysypki

- i. Czy istnieje powiązanie epidemiologiczne: tak/nie
- j. Czy w okresie poprzedzających 3 tygodni pacjent wyjeżdżał poza granice Polski? i. Jeśli tak to gdzie?
- k. Czy wykonano inne badania diagnostyczne w kierunku innych zakażeń wysypkowych: tak/nie
 - i. jeśli tak to jakie:
- l. czy pacjent był szczepiony przeciw ospie prawdziwej?

Tabela 1. Zestawienie możliwych do pobrania do badania diagnostycznego próbek materiału klinicznego wraz z podstawowymi danymi nt. pobrania oraz przechowywania/transportu.

Typ materiału	Sposób pobrania	Przechowywanie/Transport
Wymaz ze zmian skórnych (wysiłek, powierzchnia zmiany i strupy)- zmiany znajdujące się w różnych miejscach ciała	Wymaz na wirusologiczne podłoże transportowe (VTM z podłożem Hanksa)	≤5 dni w temperaturze chłodni (2-8 °C) ≥5 dni w zamrożeniu (≤-20°C, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Surowica	Sterylnie probówki z żelem separacyjnym lub pobrane „na skrzep”	≤24h w temperaturze chłodni (2-8 °C) ≥24h w zamrożeniu (≤-20°C, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Wymaz z jamy ustnej i gardła	Wymaz na wirusologiczne podłoże transportowe (VTM z podłożem Hanksa)	≤5 dni w temperaturze chłodni (2-8 °C) ≥5 dni w zamrożeniu (≤-20°C, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Wymazy z odbytu i/lub narządów płciowych	Wymaz na wirusologiczne podłoże transportowe (VTM z podłożem Hanksa)	≤5 dni w temperaturze chłodni (2-8 °C) ≥5 dni w zamrożeniu (≤-20°C, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Nasienie	Sterylny pojemnik na nasienie	≤1h w temperaturze chłodni (2-8 °C) ≥1h w zamrożeniu (≤-20°C, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)

Osocze	Sterylna probówka z antykoagulantem EDTA	<i>Krew pełną pobraną na antykoagulant należy odwirować</i> $\leq 24h$ w temperaturze chłodni (2-8 °C) $\geq 24h$ w zamrożeniu ($\leq -20^{\circ}C$, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Mocz	Sterylny pojemnik na mocz	$\leq 24h$ w temperaturze chłodni (2-8 °C) $\geq 24h$ w zamrożeniu ($\leq -20^{\circ}C$, TRANSPORT w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie – najlepiej suchy lód)
Krew pełna	Sterylna probówka z antykoagulantem EDTA	$< 1h$ w temperaturze chłodni (2-8 °C) Nie mrozić Transport łącznie z przechowywaniem nie powinien przekroczyć 48 godz.