

Variola

VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA

Variola - pravé kiahne je závažné infekčné ochorenie s vysokou nákazlivosťou a s vysokou úmrtnosťou. Nemá žiadny prírodný ani zvierací rezervoár. Prirodzeným hostiteľom pôvodcu ochorenia je iba človek. Ide teda o antroponózu, keď nákaza sa primárne šíri len medzi ľuďmi a to priamym kontaktom s chorými. Sekundárne alebo nepriamo sa môže ešte šíriť kontaminovanými predmetmi (infikovaným oblečením, kontaminovaným prachom, posteľným prádlom a podobne). Najčastejšie sa však šíri vzdušnou cestou, tzv. kvapôčkovou infekciou. Vírus varioly mimo hostiteľa je vysoko odolný a ostáva infekčným dlhé obdobie.

Predpokladá sa, že pravé kiahne vznikli v Indii, alebo v Egypte už pred 3000 rokmi. Sú najpustošivejším známym ochorením ľudstva. Opakované epidémie po stáročia zametali a decimovali obyvateľstvo zemegule. V niektorých starodávnych kultúrach variola bola takým veľkým zabijakom novorodencov a dojčiat, že bolo zakázané im dávať mená, kým dieťa nedostalo a neprežilo toto ochorenie. Variola zabila aj takých, ako boli anglická kráľovná Mária II., rakúsky cisár Jozef I., španielsky kráľ Ľudovít I., ruský cár Peter II., francúzsky kráľ Ľudovít XV., švédka kráľovná Ulrika Eleonóra a iných. Ešte v 50. rokoch dvadsiateho storočia sa každým rokom vyskytovalo 50 miliónov prípadov varioly. V dôsledku očkovania v roku 1967 to bolo už len 10-15 miliónov prípadov (z nich 2 milióny ešte umieralo).

Variola je doteraz jediným infekčným ochorením, ktoré sa prostredníctvom Svetovej zdravotníckej organizácie (SZO) podarilo celosvetovo úplne eradikovať. Eradikácia tohoto ochorenia bola zahájená v roku 1958. V roku 1967 sa tieto aktivity zintenzívnili. Cieľ bol dosiahnutý za 10 rokov, 9 mesiacov a 26 dní. Posledný prirodzený výskyt varioly bol registrovaný v októbri 1977 v Somálsku. Posledný humánny prípad (laboratórna infekcia) sa vyskytol v roku 1983. Komisia SZO pre eradikáciu pravých kiahní ukončila formálne svoju činnosť 9. decembra 1979 a očkovanie proti variole bolo celosvetovo ukončené v roku 1980. Eradikácia varioly bola vyhlásená v roku 1980 a definovaná ako vyhladenie klinických foriem pravých kiahní, ale nie ako konečná likvidácia

vírusu. Od roku 1984 boli kmene vírusu oficiálne uchovávané iba v dvoch centrách na svete. V CDC (Center for Disease Control and Prevention) v Atlante v USA a vo Výskumnom inštitúte vírusových preparátov v Moskve. Napriek tomu, že od roku 1987 SZO vyvíja snahy o likvidáciu uchovávaných vírusov, dosiaľ sa tak nestalo a preto je tu stále reálna hrozba z prípadného zneužitia tohoto vírusu vo forme biologickej zbrane. Vírusy varioly ako biologickej zbrane prichádzajú do úvahy pre ich výhodné vlastnosti. Možno ich použiť vo forme infekčných aerosólov, alebo prirodzeným šírením. Mladá populácia nemá proti ním vytvorené protilátky, preto by sa ochorenie medzi ľuďmi šírilo veľmi rýchlo a dlhodobo. Ochorenie spôsobuje vysokú úmrtnosť a dlhodobé šírenie sa nákazy medzi obyvateľstvom. U neočkovaných osôb úmrtnosť môže dosiahnuť až 50 %. U vakcinovaných okolo 6 %. Pri hemoragickom type varioly úmrtnosť dosahuje až 100 %.

Na Slovensku sa očkovanie proti variole ukončilo v roku 1980 (v ostatných krajinách SZO v roku 1984). Všetky osoby narodené po roku 1980 proti tomuto ochoreniu u nás očkované neboli a preto nemajú proti nemu ani žiadne protilátky a sú k nákaze varioly vnímavé. Ľudia narodení pred týmto obdobím boli proti tejto chorobe ešte očkovaní a preto sú voči nej čiastočne aj chránení. Po prípadnej expozícii by ochorenie u nich prebiehalo iba ľahšou formou a veľmi pravdepodobne by chorobu ďalej neprenášali. Na liečbu varioly by mohol byť použitý cidofovir, ktorý je účinným inhibítorom replikácie mnohých ortopoxvírusov in vitro, a prejavil signifikantnú klinickú účinnosť pri liečbe poxvírusovej infekcie molluscum contagiosum u ľudí. Keďže variola je eradikované ochorenie a neexistuje ani vhodný zvierací model tohto ochorenia, nie sú k dispozícii žiadne dôkazy klinickej účinnosti cidofoviru pri liečbe varioly u ľudí. Napriek tomu sú však výsledky získané testovaním účinnosti cidofoviru pri liečbe ektromélie a kravských kiahní u myší sú veľmi povzbudivé a naznačujú použiteľnosť cidofoviru v liečbe varioly. Na chemoprevenu varioly sa v minulosti skúšal metisazón, ktorý mal preukázané protektívne účinky.

ETIOLÓGIA

Variola je vírusové ochorenie, vyvolané vírusom pravých kiahní (*Variola virus*) z čeľade Poxviridae, podčeľade Chordopoxvirinae a rodu Orthopoxvirus. Tento

rod zahŕňa aj vírus vakcína (vakcíniu - vírus pre výrobu očkovacej látky), vírus kravských kiahní, vírus opičích kiahní, vírus ťavích kiahní a ďalšie, ktorých pomenovanie bolo odvodené najmä od hostiteľského zvierata, u ktorého boli zistené a identifikované.

Na vyvolanie tohoto obávaného, často smrteľného ochorenia stačí veľmi nízka infekčná dávka a to približne 10-100 organizmov v aerosóle. Vírus varioly patrí medzi najväčšie a najkomplexnejšie vírusy. Meria 260 x 150 nanometrov. Má zložitú štruktúru bez symetrie. Jeho vnútorná dreňová časť obsahuje dvojvláknovú deoxyribonukleovú kyselinu (DNA) s približne 200 rôznymi kódovanými proteínmi a viaceré enzýmy. Táto DNA je spolu s laterálnymi telieskami obalená v bielkovinovom puzdre, ktoré tvorí vonkajšiu membránu vírusu. Celá vírusová častica (virión) má tvar nábojnice oválneho tvaru. Poxvírusy sú mimoriadne odolné na fyzikálne a chemické vplyvy, čo umožňuje ich dlhodobé pretrvávanie v prostredí. Sú odolné hlavne voči vysychaniu (pri nízkych teplotách a pri nízkej vlhkosti vzduchu, v zaschnutých chrastách pretrvávajú celé mesiace), ale aj voči tukovým rozpúšťadlám, fenolom, krezolom a ich zlúčeninám.

EPIDEMIOLOGIA

Pred zavedením očkovania bola variola rozšírená po celom svete. Takmer každý sa s variolou stretol: niektorí ochoreli na klinicky manifestné formy, iní sa stali dočasnými nosičmi varioly pri miernych alebo riadnych klinických príznakoch (variola sine eruptione). Po zavedení očkovania, výskyt tejto choroby sa rapídne znížil a v súčasnosti sa už nevyskytuje. Ochorenie je celosvetovo eradikované a nie je známe, že by nejaké zviera alebo hmyz boli rezervoárom, alebo vektorom pôvodcu nákazy.

Ochorenie mávalo sezónny charakter a častejšie sa vyskytovalo v zime, alebo skorú jar. Výskyt u detí bol častejší, pretože dospelé osoby buď boli chránené vakcináciou, alebo protilátkami vytvorenými ochorením v minulosti. Variola sa z človeka na človeka šíri hlavne vzdušnou cestou a to prostredníctvom biologického aerosólu z jadier kvapôčok sekrétu z ústnej časti hltana infikovanej osoby, alebo v oveľa menšom rozsahu aj priamym kontaktom. Najčastejšie sú infikovaní členovia domácnosti, susedia a priatelia chorého.

Hoci s menším rizikom, kontaminované ošatenie, alebo postelne prádlo môžu byť tiež zdrojom šírenia sa vírusu.

Inkubačná doba ochorenia býva v rozsahu 7-17 dní (zvyčajne je to 10-12 dní). Počas tohoto obdobia osoby nejavia príznaky choroby. Cítia sa zdraví a nemôžu infikovať iných. Pacient sa stáva infekčným až v čase objavenia sa prvých príznakov choroby. Infekciozita pacienta je najvyššia počas 7-10 dní od vzniku vyrážok, keď vírus sa uvoľňuje respiračným traktom. Hoci pacient ostáva infekčným až do odpadnutia poslednej chrasty z tela, v ďalšej fáze ochorenia (keď sa tvoria chrasty a tie potom začínajú odpadávať) infekciozita klesá. Odpadnuté chrasty nie sú významným zdrojom nákazy.

V dôsledku absencie tejto choroby a vakcinácie proti nej, súčasná populácia je celkovo oveľa vnímavejšia na túto chorobu ako to bolo niekedy. Niektorí experti odhadujú, že rýchlosť šírenia sa tejto choroby by bolo 10 nových infekcií na jednu infikovanú osobu. Podiel nakazených u exponovaných neočkovaných osôb predstavuje 37-38 %. Podľa klinicko-epidemiologických vlastností a podľa pôvodcu ochorenia možno variolu rozdeliť na dve základné formy. Pre klasický typ varioly, vyvolanej vírusom variola major, bol prijatý názov variola major a pre oveľa miernejšiu formu, vyvolanú vírusom variola minor, sa používa označenie variola minor alebo alastrím.

Variola major bola najčastejšou formou varioly a vyskytovala sa približne v 90 % (u očkovaných 70 %) a bola sprevádzaná 5-25 % úmrtnosťou, niekedy aj vyššou. Túto formu varioly experti Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) rozdelili na 5 rôznych klinických typov: obvyklý, modifikovaný, bez výsevu, s plošnými léziami a hemoragický typ.

Obvyklý typ varioly major bol najčastejším. Je charakterizovaný kožnými léziami ktoré sa vyvíjajú od makúl, cez papuly, vezikuly a pustuly až po chrasty.

Modifikovaný (stredný), typ varioly major s intenzívnejším klinickým priebehom sa vyskytoval u 2 % neočkovaných a u 25 % očkovaných osôb. Táto forma varioly bola málokedy smrteľná.

Typ variola major bez výsevu sa vyskytuje u očkovaných osôb, alebo u kojencov s pretrvávajúcimi materskými protilátkami. Bez laboratórnych

sérologických testov je ťažké ho diagnostikovať, pretože priebeh tohto typu varioly býva zvyčajne bezpríznakový. Vyrážky sa u neho nevyskytujú. Prítomné sú zvýšená teplota, bolesť hlavy, bolesť v krížoch a celkové príznaky chrípky. Jeho potvrdenie vyžaduje serologický dôkaz. Tento druh varioly sa na ďalšie osoby neprenáša. Má mierny priebeh a k smrti dochádza u menej ako 1 % pacientov.

5-7 % prípadov varioly major je charakterizovaných tzv. plošnými léziami, ktoré sú splývavé a rozvíjajú sa pomalšie. Tento typ varioly major sa častejšie vyskytoval u detí (72%). U očkovaných ľudí sa vyskytoval zriedka. U neočkovaných osôb jeho prognóza bola zlá. Úmrtnosť vyvolaná týmto typom choroby bola vysoká a predstavovala až 97 %.

Hemoragický typ varioly major, ktorý sa ťažko diagnostikuje, sa vyskytoval u menej ako 3 % postihnutých. Objavoval sa väčšinou u dospelých (častejšie u žien). Pri tejto forme ochorenia inkubačná doba je o niečo kratšia ako u ostatných typov. Pri nej väčšina pacientov zomiera počas prvých siedmich dní ochorenia (obyčajne piaty, alebo šiesty deň), ešte predtým, ako sa objaví prvý výsev.

Variola minor (alistrim) sa od varioly major odlišuje hlavne miernym priebehom ochorenia a nízkou úmrtnosťou, ktorá predstavuje len okolo 1-2 %.

Špecifické protilátky pri variole sa objavujú na 5-6 deň po začiatku ochorenia, súčasne s poklesom horúčky. Imunita po prekonaní varioly je celoživotná.

PATOGENÉZA

Vstupnou bránou infekcie je respiračný trakt a jeho mukózne membrány. Hoci infekčná dávka nie je známa, predpokladá sa, že je to len niekoľko vírusových častíc. V priebehu inkubačnej doby sa vírus množí v sliznici ústnej časti hltana, v bunkách lymfatických uzlín a v bunkovej výstelke ciev a serózných blán (v retikuloendotelovom systéme - RES). Na tretí alebo štvrtý deň vzniká bezpríznaková virémia, s množením sa vírusu v slezine, v kostnej dreni a v lymfatických uzlinách. Po rýchlej fáze v období virémie sa zo začiatku manifestujú prodromálne – nejasné príznaky choroby. V tejto fáze ochorenia sa slinami ďalej infikujú ústa a hltan. Infekcia sa rýchlo šíri na ďalšie orgány

(pečeň, slezina, pľúca, kostná dreň a i.). Toto na ôsmy deň vedie k rozvoju sekundárnej virémie, sprevádzanej vysokou horúčkou a toxémiou. Množenie vírusu v endoteli kapilár umožňuje prienik infekcie k vnímavým bunkám kože a slizníc, čo vedie k rozvoju kožných lézií. Akonáhle sa vírus lokalizuje v koži, horúčka klesne. Infekcia postupne zachváti všetky vrstvy pokožky, s výnimkou stratum corneum (rohovej vrstvy). Zdurením a leukocytárnou infiltráciou vznikajú makuly (škvrny) a papuly (pupence). Tie sa neskôr menia na tzv. kiahne, čo sú vezikuly (mechúriky) a pustuly (pluzgiere). Na slizniciach sa poškodenia objavujú skôr ako na koži a majú vredový charakter. Lézie na ústnej časti hltana a na koži obsahujú veľké množstvo vírusových častíc, ktoré sú nebezpečným zdrojom infekcie. Vírus je prítomný aj v moči, v spojivkových sekrétoch, v slezine, v lymfatických uzlinách, v pečeni a v kostnej dreni. Po 10-14 dňoch od začiatku zjavného ochorenia, dochádza k zasychaniu pluzgierov s tvorbou chrást, ktoré po odlúčení zanechávajú celoživotne charakteristické jazvy. Krvácanie do pustúl je predzvesťou zlej prognózy. Často môže dôjsť aj ku komplikáciám v zmysle bakteriálnej kontaminácie kiahní.

Smrť nastáva dôsledkom toxémie (prítomnosti toxínov v krvi), spojenej s vytváraním cirkulujúcich imunokomplexov, s rozpustnými variola antigénmi a náhlejšou hypotenziou (zníženie tlaku).

KLINICKÉ PREJAVY

Ochorenie začína náhle, v plnom zdraví, s neurčitými celkovými príznakmi. Len asi u 10 % chorých je začiatok pozvoľný. Toto prodromálne štádium s nejasnými príznakmi trvá 2-3 dni a prejavuje sa bolesťami hlavy, chrbtice, teplotou, ktorá často dosahuje až 40°C. Vysoká horúčka a celkový ťažký stav pretrvávajú aj ďalšie dni. Na jazyku, ústnej časti hltana a v ústach sa objavuje enantém (vyrážka), ktorý sa rýchlo mení na raž, neskôr na malé, začervenalé chorobné škvrny. Tie sa v priebehu ďalších 1-2 dní menia na papuly (pupence) s priemerom 2-3 mm. Na tretí až štvrtý deň ochorenia pri stále ťažkom stave začne erupcia vlastného exantému. Prvé kožné lézie sa objavujú na tvári a končatinách a postupne postihujú celé telo. Vytvárajú sa drobné, v priemere 2-3 mm veľké makuly (škvrny). Tie sa zväčšujú a rýchlo sa menia na papuly a behom niekoľkých ďalších hodín na pluzgiere, naplnené čírou tekutinou. Obraz ochorenia sa mení z hodiny na hodinu. Malé mechúriky sa zväčšujú a menia sa

na pľuzgiere do veľkosti 4-6 mm. Po výsype sa celkový stav pacienta zlepší. Zmiernia sa bolesti a poklesne teplota. Zlepšenie je len prechodné, lebo po niekoľkých hodinách až 2 dňoch dochádza opäť k zhoršeniu stavu. Vystúpi teplota, vracajú sa bolesti hlavy, svalov a kĺbov. Vzniká najťažšie obdobie priebehu varioly, tzv. pustulózne štádium, keď sa vezikuly menia na pustuly. To nastáva asi na 6. - 8. deň od začiatku ochorenia. Od ôsmeho dňa sa pustuly preliačujú a začínajú krustovať. V druhom týždni choroby sa krusty (chrasty) začínajú odlupovať. Odľučovanie krúst trvá 30-40 dní. Keď chorý pustulózne štádium choroby prežije, celkový jeho stav sa začne zlepšovať. Klesá teplota, defekty na slizniciach sa hoja. U osôb ktoré prekonal variolu, po pľuzgieroch v 65-80 % zostávajú stopy a jamkovité zjazvenia ktoré sa častejšie vyskytujú na tvári a končatinách ako na trupe.

Ochorenie je často sprevádzané rôznymi komplikáciami. Veľmi často môžu vzniknúť rôzne sekundárne bakteriálne nákazy, hlavne stafylokoková. Panoftalmitída (hnisavý zápal celého oka) a oslepnutie po prekonaní vírusovej keratitídy (zápale očnej rohovky) alebo sekundárnej infekcii sa vyskytuje u 1 % pacientov (v 18. storočí v Európe tretina všetkých prípadov slepoty bola spôsobená variolou). Artritída (zápal kĺbov) a trvalá deformácia kĺbov sa môžu vyskytnúť u 2 % pacientov. Vyskytujú sa hlavne u detí. Ich príčinou je vírusová infekcia metafýzy (rastovej časti kosti). Častým sprievodným znakom je aj kašeľ, ktorý je predzvestou respiračných komplikácií a to predovšetkým zápalu pľúc, alebo bakteriémie, ktorých dôsledkom je veľmi často aj smrť. Teplota, bolesti v krku a konjunktivitída (zápal spojovky) sa môžu objaviť aj u úplne imúnnych jedincov, ktorí boli vystavení k vírusu respiračnou cestou. U týchto ľudí tieto príznaky môžu pretrvávajúť až niekoľko dní. Tieto osoby vylučujú vírusy, ktoré sú schopné infikovať a šíriť variolu ďalej na vnímavé osoby.

DIAGNOSTIKA

Každé zistenie, alebo len podozrenie z výskytu varioly predstavuje mimoriadne nebezpečenstvo, alebo medzinárodnú hrozbu pre zdravotníctvo na celom svete. Takémuto prípadu musí byť okamžite venovaná mimoriadna pozornosť a prípad musí byť okamžite hlásený miestnym a štátnym orgánom zdravotníctva a Svetovej zdravotníckej organizácii, aby sa mohli vykonať okamžité opatrenia, ktoré by mali celosvetový dosah.

Klinická diagnostika

Väčšina prípadov varioly sa vyskytuje vo forme variola major, ktorá je charakteristická svojimi vyrážkami s radiálnou (odstredivou) distribúciou. Hustejšie sú na tvári a končatinách, ako inde na tele. Lézie sa objavujú v 1-2 dňových cykloch a vyvíjajú sa rovnakým tempom. Na ktoromkoľvek mieste tela sú obyčajne v rovnakom štádiu vývoja. Ochorenie sa môže zmýliť s varicelou (ovčímí kiahňami). Pri varicеле nové lézie sa objavujú vo výsevoch po niekoľkých dňoch a sú v rôznych štádiách dozretia (vezikuly, pustuly a chrasty). Okrem toho lézie sú povrchovejšie a takmer nikdy sa nenachádzajú na dlaniach a chodidlách. Rozmiestnenie varicela lézií je dostredivé, s väčšou koncentráciou na trupe ako na tvári alebo končatinách. Variola sa ešte môže zmýliť s multiforným erytémom, alergickou dermatitídou, syfilisom a rôznymi inými kožnými ochoreniami.

Hemoragická forma varioly bola často zo začiatku diagnostikovaná ako meningokoková sepsa, alebo akútna leukémia. Prejavuje sa výsevom vyrážok sprevádzaných krvácaním slizníc a kože. Je takmer vždy smrteľná.

Laboratórna diagnostika

Z hľadiska možnej laboratórnej nákazy, variola patrí medzi najrizikovejšie ochorenia a preto práca s týmto agensom si vyžaduje tie najprísnejšie bezpečnostné opatrenia. Laboratórna diagnostika varioly sa môže vykonávať iba na pracoviskách na to určených. Vybavenie laboratórií a metódy prác musia zodpovedať stupňu biologickej bezpečnosti BSL-4. Za týchto podmienok musí byť materiál aj odoberaný a transportovaný. Všetci laboratórni pracovníci musia byť proti tomuto ochoreniu očkovaní.

Keď už raz bolo dokázané, že epidémia je vyvolaná vírusom varioly, ďalšie laboratórne potvrdenia už nie sú potrebné.

Odber a transport materiálu

Na laboratórny dôkaz varioly sa odoberá nasledovný materiál:

- a) Krv na sérologické, kultivačné a PCR vyšetrenie (Polymerase Chain Reaction).

- Na dôkaz prítomnosti protilátok sa odoberá cca 10 ml žilovej krvi do suchej sterilnej skúmavky. Obvykle sa odoberajú 2 vzorky krvi.
 - Na izoláciu vírusu vo včasnej preeruptívnej (pred výsevom) fáze ochorenia sa odoberá krv do sterilných nádobiek s heparínom (10j/ml).
 - Na dôkaz nukleových kyselín vírusu (PCR vyšetrenie) sa odoberá plná žilová krv (1-2 ml) do EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina) alebo do 3,8 % roztoku citrátu sodného (1:9).
- b) **Sliny** sa odoberajú vo včasnej preeruptívnej fáze ochorenia, cca 1 ml do sterilnej odberovej nádoby na izoláciu vírusu kultiváciou a na PCR vyšetrenie.
- c) **Nátery**. Vatovým tampónom nasýteným v alkohole alebo v éteri sa očistí povrch šiestich a viac lézií. V makulo-papulóznom štádiu sa lézie zoškrabnú, resp. zrežú skalpelom, alebo injekčnou ihlou sa získa materiál zo spodných epitelových vrstiev kože. Takýto materiál sa tenko naniesie na čisté podložné sklíčka. Z vezikúl a pustúl sa tekutina nasaje do sklenených kapilár alebo do malej (2 ml) striekačky a uchová sa na mikroskopické, kultivačné, sérologické alebo PCR vyšetrenie. Spodina vezikúl a pustúl sa zoškrabne ihlou alebo skalpelom ako materiál na prípravu náterov na sklíčka. Nátery vysušené na vzduchu nie je potrebné fixovať. Jednotlivé sklíčka sa pomocou pinzety uložia do krabice na transport do laboratória.
- d) **Tekutina** z vezikúl a pustúl sa odoberá do nezatavených sklenených kapilár alebo do mikropipiet a uloží do nádoby s tesným uzáverom. Tekutinu možno nasať aj do menšej striekačky, ktorá sa uloží do sterilnej skúmavky uzavretej gumenou zátkou.
- e) **Chrasty** (krusty), najmenej v počte 12, sa uložia do sterilnej transportnej nádoby s tesným uzáverom.
- Odobraté materiály sa do laboratória dopravujú pri izbovej teplote a to čo najrýchlejšie (do 24 hod.), inak je potrebné ich zmraziť. Transport by mal vykonávať patrične poučený špeciálny kuriér. Vzorky musia byť balené a prepravované za podmienok zodpovedajúcich stupňu BSL 4, t.j. zabalené v do troch obalov a opatrené zreteľným nápisom „Vysoko nakažlivý materiál“. Sprievodný lístok má obsahovať nasledovné údaje: meno a vek pacienta, anamnézu, začiatok a krátky popis klinického priebehu

ochorenia, začiatok výsevu vyrážok, údaj o prípadnej vakcinácii, kontakty s chorými, príp. cestovnú anamnézu.

A/ Mikroskopické vyšetrenie

1. Svetelná mikroskopia farbených náterov Gutsteinovou metódou, alebo Gispenovou modifikáciou Morosovovej metódy striebrenia, slúži na orientačnú diagnostiku varioly. Musí byť však používaná spolu s inými metódami, pretože neumožňuje odlíšenie varioly od iných poxvírusov. Negatívny nález diagnózu varioly ešte nevyklučuje. Tieto metódy sú citlivé na interpretáciu výsledkov a preto sa nepoužívajú.
2. Elektrónová mikroskopia z materiálov z kožných lézií v ktoromkoľvek štádiu ochorenia sa pokladá za jeden z najspoľahlivejších testov v diagnostike varioly. Umožňuje rýchlu a spoľahlivú identifikáciu variola vírusových častí a ich odlíšenie od iných vírusov, najčastejšie od vírusu varicella-zoster, prípadne zmiešaných infekcií. Nedá sa ale rozlíšiť, či ide o variolu, vakcíniu, alebo o monkey pox vírusy, pretože všetky sú morfológicky veľmi podobné. Táto metóda hoci pri hodnotení výsledkov vyžaduje určité skúsenosti, umožňuje poskytnúť výsledok do 30 minút od obdržania vzorky.

Postup: materiál na prípravu náterov na podložné sklíčka sa získava pomocou kvapky sterilnej destilovanej vody. Krusty sa rozotrujú v malom objeme destilovanej vody. Materiál sa nanesie na formvarovú blanu. Po usušení sa sieťka trikrát po sebe opláchne kvapkou destilovanej vody, s následným odsatím prúžkom filtračného papiera. Kvapkou 1% glutaraldehydu, ktorá sa nechá pôsobiť 30 sekúnd, sa vírus varioly inaktivuje. Sieťka sa opäť 3x premyje destilovanou vodou a preparát sa ofarbí 2% fosfovolfrámanom draselným (pH 7). Po 5 sekundách sa farbivo odstráni odsatím filtračným papierom a preparát sa nechá zaschnúť. Materiál sa vyšetruje pri 20 000 – 40 000 násobnom zväčšení. Vírusové partikuly sú viditeľné behom minúty, ale preparát sa pozorne prehlíada najmenej 10 minút.

3. Imunofluorescenčné vyšetrenie náterov z kožných lézií, z tekutiny z vezikúl a z pustúl. Metóda je vhodná aj na vyšetrenie infikovaných bunkových kultúr. Nemôže byť však použitá ako jediná metóda, lebo pri nej sa

vyskytuje množstvo falošne pozitívnych výsledkov. Používajú sa dve metódy, priama a nepriama imunofluorescencia.

B/ Vyšetrovanie na prítomnosť vírusového antigénu

Na dôkaz vírusového antigénu v tekutinách v mechúrikoch alebo v pluzgierikoch bol vyvinutý flokulačný a komplement fixačný test. Ten druhý je považovaný za vhodnejší. Boli vyvinuté aj ďalšie sérologické testy na dôkaz vírusového antigénu, ale do praxe v rozšírenej miere zavedené neboli.

Komplement-fixačný test (KFR) detekcie antigénu v klinických vzorkách

Na prítomnosť antigénu je možné testovať:

- a) Krvné sérum – z hemoragických alebo fulminantných (rýchlo prebiehajúcich) prípadov. Použije sa sérum riedené veronalovým pufrom v pomere 1:2 a inaktivované zahriatím na 58°C počas 30 min.
- b) Nátery z papúl (pupenčekov), vezikúl (mechúrikov) a pustúl (pluzgierov). Materiál z 2-3 sklíčok sa zoškrabe a suspenduje v 1 ml fyziologického roztoku a nechá pri laboratórnej teplote postáť 1 hod. 0,2 ml sa riedi s fyziologickým roztokom s antibiotikami a použije na izoláciu vírusov na kuracích embryách alebo na bunkových kultúrach. Zvyšok suspenzie sa 15 min. centrifuguje pri 1500 ot./min. Supernatant sa 30 min. zahreje na 58°C a použije ako antigén v komplementfixačnej reakcii.
- c) Tekutina z vezikúl a pustúl.
- d) Ku vzorke sa pridá 1 ml fyziologického roztoku a nechá sa 1 hod. postáť pri laboratórnej teplote. K 0,2 ml sa pridajú antibiotiká a tento materiál sa použije na izoláciu vírusu. Zvyšok vzorky sa pri nízkych otáčkach scentrifuguje. Ako antigén na reakciu sa použije supernatant zahrievaný 30 min. pri 58°C.
- e) Chrasty (krusty) je potrebné najprv vysušiť a to tak, že sa v skúmavke rozdrví sklenenou tyčinkou a pridá sa 4-5 ml éteru. Po 30 min. sa éter odpipetuje a zbytok sa nechá vo vodnom kúpeli odpariť pri 37-50°C. Rozdrvené krusty sa potom rozpustia vo fyziologickom roztoku tak, aby vzniklo riedenie 1:100. Materiál sa pri laboratórnej teplote za občasného pretrepania eluuje 2 hod. Suspenzia sa 15 min. centrifuguje pri 1500 ot./min. Supernatant sa 30 min zahrieva pri 58°C.

Najprv sa testuje antivakcinálne králičie sérum v sériových dvojnásobných riedeniach oproti sériovým riedeniam vakcinálneho antigénu. Riedenie zvolené na použitie pri testovaní extraktov z klinického materiálu predstavuje najvyššie riedenie séra, ktoré poskytuje plnú fixáciu s najvyššie pozitívne reagujúcim riedením antigénu.

POSTUP

Pri skúmovkovom prevedení reakcie pri riedení extraktov, antiséra aj komplementu je výhodné používať objemy 0,1 ml. Extrakty sú testované tiež s normálnym sérom riedeným ako imúnne sérum. Vždy sa do reakcie zaraďuje známy pozitívny antigén vo vhodných riedeniach. Reakcia prebieha 18-24 hod. pri 4°C. V nasledujúci deň sa skúmavky na 10 min. uložia do 37°C vodného kúpeľa. Potom sa do skúmaviek pridajú senzibilizované krvinky a znovu sa inkubujú vo vodnom kúpeľi.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak dve alebo viac skúmaviek vykazuje kompletnú fixáciu komplementu, zatiaľ čo samotné riedenie antigénu a antigénu s normálnym králičím sérom vykazujú hemolýzu, možno test považovať ako za pozitívny dôkaz prítomnosti varioly-vakcínie antigénu. Približne dve tretiny sér z hemoragických prípadov kiahní vykazuje s antigénom riedeným 1:10 pozitívny KFR výsledok (niekedy až v riedení 1:160 - 1:320). Sérum z bežných prípadov kiahní vykazuje obyčajne pri KFR reakcii negatívny výsledok. Extrakty z krúst obvykle vykazujú fixáciu komplementu až do riedenia 1:3000 a 1:5000 a tekutina z vezikúl a pustúl až do 1:300 až 1:500. Pozitívny výsledok neumožňuje potvrdiť či sa jedná o variolou alebo vakcínou, ale definitívne vylučuje prípad varicelly, prípadne herpes simplexu, ktoré by mohli prísť do úvahy pri diferenciálnej diagnostike.

C/ Izolácia vírusu na bunkových kultúrach a na kuracích embryách

Izolácia vírusu na bunkových kultúrach a na kuracích embryách umožňuje s istotou odlíšiť vakcíniu od pravej varioly a tiež rozlíšiť vírusy variola major a variola minor.

1. Izolácia vírusu na chorioalantoide kuracieho embrya

Pretože ortopoxvírusy dobre rastú na chorionalantoidnej membráne kuracích embrií, kde vytvárajú zreteľne odlišné kiahne (jamky, jazvy) a pre vírus varioly charakteristické, táto metóda izolácie vírusov sa stala dôležitou pri diagnostike varioly. Umožňuje poskytnúť výsledky do 3 dní.

Na izoláciu vírusov sa používajú 11-13 dňové kuracie embryá. Na prípravu suspenzií a na riedenie materiálu na inokuláciu sa používa fosfátový pufovaný fyziologický roztok, Hanksov, alebo Earleov solný roztok s 10 % živného bujónu. Ku všetkým týmto roztokom sa pridáva penicilín (500j/ml) a streptomycín (500µg/ml).

Krv – na izoláciu vírusu sa používa heparinizovaná krv. Aby sa oddelili červené krvinky od plazmy, tak sa nechá odstáť 1 hod. pri izbovej teplote. Supernatantná plazma sa odoberie a centrifuguje. Supernatant a resuspendované sedimentované leukocyty sa v množstve 0,1 ml inokulujú do embrií zvlášť. V prípade zrazenej krvi sa očkuje sérum a rozotrená krvná zrazenina. Z krvi je možné vírus izolovať zvyčajne pri fulminantných (rýchlo prebiehajúcich) prípadoch varioly. U iných prípadov kiahní iba v prvých dvoch dňoch horúčky.

Sliny – sa môžu vyšetrovať vo včasných štádiách ochorenia a len v eruptívnej fáze ochorenia. Materiál sa pred inokuláciou nariedi s rovnakým objemom riediaceho roztoku.

Nátery na sklíčkach – sa používajú z lézií v rôznom štádiu erupcie. Materiál sa resuspenduje v 1 ml riediaceho roztoku a použije na inokuláciu. Tento roztok sa potom ďalej zriedi 1:100 a tiež sa použije na inokuláciu.

Tekutiny vezikúl a pustúl – sa suspendujú v 1 ml riediaceho roztoku. Inokulujú sa aj riedenia 1:100 a 1:1000.

Chrasty (krusty) – sa rozdrvia v 1-2 ml riediaceho roztoku. Suspenzia sa nechá stať 10-15 minút alebo sa ľahko centrifuguje, aby sa hrubšie časti materiálu usadili. Na inokuláciu sa používa supernatant a jeho riedenie 1:100.

POSTUP

Technika očkovania na chorionallantois kuracieho embrya je bežne známa. Po inokulácii sa embryá inkubujú pri 36°C. Niektoré vajcia sa kontrolujú a otvárajú za 2 dni, ostatné po troch dňoch inkubácie. Vaječná škrupina nad vzduchovým priestorom sa odstráni sterilnou pinzetou a exponovaná chorioallantois sa vystrihne nožničkami niekoľko milimetrov za líniou prichytenia blany na škrupinovú membránu. Membrány sa prezerajú mikroskopicky v tmavom poli.

INTERPRETÁCIA

vírusy varioly major a varioly minor vytvárajú po 48 hodinách maličké konvexné šedavo-biele lézie s priemerom 0,5 až 1 mm. 48 hodinové lézie vírusu vakcínie sú matne biele s hladkým povrchom a priemerom asi 1-2 mm. Za 3 dni po očkovaní je rozdiel ešte zreteľnejší. Lézie varioly sú matne biele, zvýšené, s priemerom okolo 1 mm, s hladkým lesklým povrchom. Lézie vakcínie sú väčšie (3-4 mm), ploskejšie a často majú skalene zvrásnený, vredovitý povrch. Lézie tvorené vírusom kravských kiahní majú v tejto dobe priemer 2-3 mm, načervenalú farbu, čo je spôsobené krvácaním do mezodermu. Vírus varicelly netvorí na chorionallantois žiadne zmeny. Jediným vírusom, ktorý pri vyšetrení klinického materiálu môže robiť diagnostické problémy, je vírus herpes simplex. Obvykle však tento vírus tvorí maličké lézie, menšie ako u varioly. Niektoré kmene však môžu byť varioly veľmi podobné.

2. Izolácia vírusu na bunkových kultúrach

Vírus varioly rastie a tvorí cytopatický efekt na rôznych bunkách z ľudských a zvieracích tkanív. Na izoláciu vírusu sa najčastejšie používajú ľudské embryonálne bunky kožno-svalového tkaniva, HeLa bunky, alebo bunky z opičích ľadvín.

POSTUP

Pre štúdium farbených preparátov a pre vyšetovanie fluorescenčnými protilátkami sú najvhodnejšie Leightonove skúmavky s jednovrstvovými kultúrami buniek na povrchu krycích sklíčok. Materiál na inokuláciu sa pripravuje rovnako ako na inokuláciu kuracích embryí. Ako riediace médium je však lepšie použiť Hanksov pufrovaný solný roztok s 10 % bujónu s pridaním hovädzieho plodového séra. Skúmavky s bunkovými kultúrami sa inkubujú 1-3 hodiny pri 36-37°C. Potom do každej z nich sa pridá 0,9 ml média a skúmavky sa znova inkubujú v termostate. Každá vyšetovaná vzorka a jej riedenia sa očkujú najmenej na 3 kultúry. Prítomnosť cytopatických zmien sa 2x denne kontroluje stereomikroskopom (binokulárnou lupou) pri malom zväčšení (4x). Ako kontrola, do každého testu sa zaraďujú neočkované kultúry.

INTERPRETÁCIA

Vírus varioly: Doba potrebná k objaveniu sa cytopatického efektu závisí od množstva vírusu v inokule. U klinických materiálov sa zmeny môžu objaviť za 24 hod., ale aj o 3 a viac dní. V HeLa bunkách alebo v iných líniách derivovaných z normálneho ľudského tkaniva variola za 1-3 dni produkuje malé (1-3 mm), jemné hyperplastické ohniská. Neskôr sa rozvíjajú malé jasné plaky, ohraničené zaguľatenými balónovými, niekedy až obrovskými bunkami. Z normálneho tkaniva v primárnych kultúrach hyperplastické ložiská sa netvoria a neprodukujú ich ani vírusy vakcínie a kravských kiahní. V kultúrach z ľudskej vnútornej plodovej blany (amnia) a v opičích ľadvinových bunkách sa za 3-4 dni tvoria malé plaky a cytopatický efekt sa šíri len veľmi pomaly. Pre množenie vírusu kiahní sú obzvlášť vhodné ľudské plodové diploidné bunky. Pri veľkom inokule tu možno vidieť cytopatické zmeny už za 24 hod. v podobe ložiskovej bunkovej degenerácie. Bunky sa zaguľacujú a v ložiskách sa objavujú mnohojadrové bunky. Hyperplastické ložiská a malé plaky po ofarbení silným roztokom karbolfuchsínu (20-60 sekúnd) sú viditeľné aj voľným okom. Príslušnými farbiacimi metódami možno za 24 hod. po infekcii v preparátoch na sklíčkach pozorovať cytoplazmatické inklúzie a fluorescenčnými protilátkami v tej istej dobe ložiská fluorescenčných buniek.

Vírus vakcínie: Cytopatický efekt sa často objavuje za 24 hod. a jasné plaky veľkosti 2-6 mm obrúbené zaguľatenými bunkami sú prítomné za 40-48 hodín. Skoro nato sa objavujú sekundárne ložiská infekcie a za 3-4 dni môže byť postihnutá už aj celá bunková vrstva.

Vírus herpes simplex: Cytopatický efekt produkovaný týmto vírusom sa objavuje rýchlo a postihuje celú bunkovú kultúru.

Vírus varicely: Pri primárnej izolácii vírus varicely netvorí cytopatický efekt skôr ako za 4-6 dní. Po tomto čase sa objavujú ohniská zaguľatených buniek a v kultúrach opičích a ľudských buniek možno nájsť veľké mnohoadrové bunky. Vírusy herpes simplex a varicella zoster v infikovaných kultúrach vyvolávajú tvorbu intranukleárných inklúzií.

3. Identifikácia vírusu v kuracích embriách alebo v bunkových kultúrach

Na identifikáciu vírusu izolovaného na chorioalantoide kuracieho embrya môžu byť použité nasledujúce testy:

- a) mikroskopické zhodnotenie vytvorených lézií
- b) histologické zhodnotenie lézií v parafínových rezoch chorioalantoidu (vakcínia a variola tvoria cytoplazmatické inklúzie, zatiaľ čo herpetické lézie majú intranukleárne inklúzie)
- c) 20% solný extrakt silne infikovaných membrán hemaglutinuje
- d) precipituje v agarovom géli a fixuje komplement s antivakcinálnym králičím sérom.

Tieto skúšky slúžia na odlíšenie varioly od herpes simplex. Nedokážu ale odlíšiť vírus vakcínie od varioly. Na ich rozlíšenie sa používa inkubácia infikovaných vajec pri rôznych teplotách (36°C a 39-40°C). Ak ide o vírus varioly, lézie v chorioalantois sa objavujú len u vajec inkubovaných pri 36°C. Pri teplote 39-40°C sa lézie neobjavujú. Pri vakcínii sa lézie v chorioalantois objavujú pri oboch teplotách.

Na odlíšenie vírusov skupiny variola-vakcínia z bunkových kultúr od skupiny herpetických vírusov, slúži hemadsorpčný test. Používajú sa pri ňom vhodné kuracie erytrocyty, testované dopredu s vírusom vakcínie. Do kultúr s izolátmi sa pridáva 0,2 ml 0,5% suspenzie premytých krviniek. Skúmavky sa nechajú

postáť 15 min. pri izbovej teplote, potom sa s nimi rázne zatrepe a prezerajú sa pod mikroskopom. Hemadsorpcia sa prejavuje adhézou krviniek na infikovaných bunkách. Tento test býva pri kultúrach varioly aj vakcínie často pozitívny za 24 hodín, ešte pred objavením sa cytopatického efektu. Vírus Herpes simplex sa neprejavuje hemadsorpciou. Keď sa na bunkových kultúrach potvrdí izolácia vírusu a sú pochybnosti či sa jedná o vírus varioly alebo vakcínie, so suspenziou infikovaných bunecných kultúr sa vykoná ďalšia pasáž na kuracích embriách a v ďalších bunecných kultúrach, ktoré sa inkubujú pri 36 a 39-40°C. Ak vírus vytvára lézie pri oboch teplotách, je to vakcína, ak sa vytvorí len pri nižšej teplote, ide o variolu.

D/ Sérologická diagnostika varioly

Pred 5.-6. dňom ochorenia sú protilátky voči variole u infikovaných osôb nedetekovateľné. V tejto dobe u väčšine prípadov sa vyvíja erupcia (výsev vyrážok) a diagnóza môže byť stanovená detekciou vírusu alebo vírusového antigénu v kožných léziách. V prípadoch, keď sa diagnózu nepodarilo stanoviť (nie je k dispozícii žiaden materiál z kožných lézií), alebo sa jedná o variolu bez erupcie, vyšetrenie na dôkaz protilátok v sére môže byť jedinou laboratórnou skúškou, ktorou môže byť potvrdená povaha infekcie. Dôkaz protilátok a ich kvantifikácia sa vykonáva tiež pre hodnotenie stavu imunity populácie. Na dôkaz protilátok bolo vyvinutých viacej sérologických reakcií, ktoré sa značne líšia v citlivosti, resp. v špecificite.

1. Reakcia väzby komplementu (KFR, komplement-fixačná reakcia)

Táto reakcia je považovaná za najvýhodnejšiu. Na jej vykonanie sa používajú antigény pripravené z infikovanej králičej kože, alebo kuracieho chorioalantoidu. Tieto antigény ale komerčne nie sú dostupné.

POSTUP

Všetky séra pred vyšetrením sú inaktivované 15 minútovým zahriatím na 58°C. Dvojnásobné riedenia séra začínajúc 1:5 sú následne zmiešané s dvomi jednotkami komplementu a stanovenou konštantnou dávkou antigénu (optimálna koncentrácia antigénu sa stanovuje dvojrozmernou titráciou rôznych riedení antigénu oproti riedeniam imúnneho séra). Zmes sa uloží na

noc pri 4°C a nasledujúci deň sa pridávajú krvinky (0,5% suspenzia premytých kuracích erytrocytov). Do reakcie sa zaraďujú kontroly s riedenými sérami a kontrolným antigénom, s riedenými sérami bez antigénu a pozitívne sérum so známym titrom protilátok.

INTERPRETÁCIA

Väčšina sér od pacientov s kiahňami dáva pozitívne výsledky už po 7 dňoch ochorenia. Na 10-11 deň môže titer protilátok dosiahnuť hodnoty aj vyššie ako 1:640 alebo 1:1280. Ak sa kiahne prejavia u očkovaných osôb, pozitívna reakcia býva už na 5. deň ochorenia. U týchto osôb je obvykle titer KF protilátok nízky, zriedka vyšší ako 1:40. V riedení séra 1:5 býva negatívny. Keďže KF protilátky vytvorené očkovaním sa strácajú za 6-12 mesiacov, titer 1:20 a viac, poskytuje u človeka, ktorý nebol očkovaný v minulom roku, pravdepodobný dôkaz infekcie variolou. 4-násobný vzostup titra medzi dvomi vzorkami séra s odstupom 1-3 týždne je presvedčivým dôkazom ochorenia.

2. Hemaglutinačno-inhibičný test (HI test)

Aj keď niektoré kmene prípadne mutanty neprodujú HI protilátky, tento test pre jeho jednoduchosť bol často využívaný. Hemaglutiníny sa objavujú už v počiatkových štádiách ochorenia. Hoci HI protilátky u infikovaného človeka pretrvávajú po jeho uzdravení len niekoľko mesiacov, ale predsa len dlhšie, ako KF protilátky.

a) Príprava hemaglutinínu

Vakcínou infikované kuracie chorioalantoíny sú rozotrené so skleneným prachom a potom suspendované v 0,85 % fyziologickom roztoku s 1% inaktivovaným normálnym králičím sérom v množstve 2 ml na 1 membránu. Suspenzia sa 15 minút centrifuguje pri 2000 ot./min.. Supernatant s obsahom hemaglutinínu v obvyklom titre 1:128 až 1:256 sa môže v zmrznutom stave pri -20°C uchovávať niekoľko mesiacov.

Hemaglutinín je možné pripraviť aj z kultúr opičích ľadvín infikovaných vakcinálnym vírusom. Vyrastené bunkové kultúry sa po odstránení média omyjú pufrovaným Hanksovým solným roztokom. Potom sa pridá vírus vakcínie (asi 1000 TCD50 pre opičie obličkové bunky) a nové médium, zložené

z rovnakých dielov média H-199 a E-MEM bez séra. Kultúry sa inkubujú dovtedy, kým sa nevytvorí úplný cytopatogénny efekt (obyčajne 3-4 dni). Bunky sa následne suspendujú v médiu a rozbijú sa ultrazvukom asi 5 minút. Tekutina sa 10 minút centrifuguje pri 1500ot./min. a supernatant sa použije ako hemaglutinín, obvykle s titrom 1:128.

b) Kuracie erytrocyty

Vhodné sú len niektoré krvinky, ktoré treba stanoviť testovaním s mikroflokulačným antigénom kardiolipínu v riedení 1:10 000. Krv sa odoberá do Alsaverovho roztoku a krvinky sa 3-krát premýjú 0,85 % fyziologickým roztokom. Premyté krvinky sa používajú vo forme 0,5% suspenzie vo fyziologickom roztoku. Bunkové suspenzie sa testujú pridaním 0,25 ml sériových dvojnásobných riedení hemaglutinínu k 0,25 ml suspenzie krviniek pri celkovom objeme 0,75 ml v skúmavke (do každej skúmavky sa pridá aj 0,25 ml fyziologického roztoku). Skúmavky sa nechajú 1 hod. pri laboratórnej teplote. Hemaglutinácia sa prejavuje usadením aglutinovaných krviniek nad dnom skúmaviek. V skúmavkách bez hemaglutinácie erytrocyty majú tvar kompaktného krúžku v centre dna skúmavky. Do reakcií sa vyberajú citlivé krvinky.

POSTUP

Vyšetrované séra sa najprv inaktivujú 15 min. pri 58°C. K 0,2 ml séra sa pridá k 0,6 ml fyziologického roztoku a 0,2 ml 20% suspenzie premytých kuracích erytrocytov. Zmes sa uloží na 1 hod. do chladničky (4°C) a potom sa centrifuguje 10 min. pri 1500 ot./min. Do testu sa použije supernatant, ktorý predstavuje riedenie séra 1:5. Hemaglutinín sa riedi podľa predchádzajúcej titrácie tak, aby obsahoval 4 hemaglutinačné jednotky v 0,25 ml hemaglutinínu. Z absorbovaných sér sériové dvojnásobné riedenie, ktoré sa rozpipetuje po 0,25 ml do rady skúmaviek. Do každej skúmavky sa pridá 0,25 ml hemaglutinínu. Vedľa toho sa do 5 ďalších skúmaviek napipetuje 0,25 ml hemaglutinínu neriedeného a riedeného 1:2, 1:3, 1:4 a 1:6 a do každej z nich sa pridá 0,25 ml fyziologického roztoku (kontrola jednotky hemaglutinínu). Skúmavky sa uložia na 1 hodinu do vodného kúpeľa pri 37°C, potom sa pridá 0,25 ml suspenzie krviniek a ponechajú 1 hod. pri laboratórnej teplote. Potom

sa odčíta výsledok. Titer antihemaglutinínu v sére je určený najvyšším riedením séra, ktoré inhibuje aglutináciu erytrocytov. Do každého testu je potrebné zaradiť kontrolné pozitívne sérum so známym titrom HI protilátok.

INTERPRETÁCIA

Postvákcináčné séra mávajú HI titre 1:80 alebo 1:100, ale tieto protilátky obvykle vymiznú behom 1-2 rokov. V sére pacientov s variolou sa HI protilátky objavujú asi na 4.-5. deň ochorenia a u rekonvalescentných sér môže titer dosiahnuť hodnoty 1:1000 a viac. Štvornásobný vzostup titra protilátok v sérach odobratých v rozpätí 7-14 dní potvrdzuje infekciu vyvolanú vírusom varioly alebo vakcínie.

3. Neutralizačný test (NT)

Tento môže byť vykonaný zisťovaním redukcie kiahní na chorioalantoidnej membráne kuracieho embrya, alebo sledovaním plakov alebo redukcie ložísk na bunkových kultúrach. Použitie druhej z týchto metód je jednoduchšie. V obidvoch prípadoch musí byť použitá vírusová suspenzia so známou infektivitou. Z bunkových kultúr sú vhodné opičie ľadvinové bunky v Leightonových skúmavkách. Možné je aj použiť mikrotitračné platničky s plochým dnom. Suspenzia buniek sa nechá vyrásť v prostredí zloženom z 50 % média H-199 a 50% Eagleova MEM a obohatené 10 % boviným fetálnym sérom. Vhodnejšie je použiť vírus vakcínie ktorý bol niekoľkokrát pasážovaný na opičích ľadvinových bunkách. Množstvo pridaného vírusu sa stanoví titráciou a to tak, aby 0,1 ml inokula na monolayeri opičích ľadvinových buniek vytvorilo približne 100-150 plakov.

POSTUP

Vyšetrované séra sa inaktivujú (20 min. pri 58°C) a nariedia sa s udržiavacím médiom v dvojnásobnom riedení, počínajúc riedením 1:5. Udržiavacie médium je rastové médium bez boviného fetálneho séra. K 0,5 ml príslušného riedenia séra sa pridáva 0,5 ml vhodne nariedeného vírusu. Zmes sa inkubuje 2 hodiny pri 37°C. Do testu je vždy potrebné zaradiť aj negatívnu a pozitívnu kontrolu so známym titrom protilátok. Po inkubácii sa médium odsaje a monolayer sa premyje teplým pufrovaným Hankovým solným roztokom. Do každej

skúmavky sa pridá 0,1 ml príslušnej zmesi séra a vírusu. Potom sa do všetkých skúmaviek pridá po 0,9 ml udržiavacieho séra a kultúry sa nechajú inkubovať v termostate.

Kontrolné skúmavky naočkované vírusom zmiešaným s negatívnym sérom v riedení 1:10 sa prehliadajú pod mikroskopom po 38-40 hodinovej inkubácii. Ak sú viditeľné lézie, médium sa odstráni zo všetkých kultúr a monolayer sa 20-60 sekúnd ofarbí silným roztokom karbolfuchsínu. Farbivo sa potom vymyje fyziologickým roztokom a jasné plakety na ofarbenom poraste sa spočítajú. Stanoví sa priemerný počet plakov na skúmavku (zvlášť pre každú zmes vírus – sérum. Vypočíta sa 50% redukcia počtu plakov vyšetrovaného séra v porovnaní s kontrolami.

INTERPRETÁCIA

Riedenie séra, ktoré redukuje počet plakov na 50% v porovnaní s kontrolou, predstavuje neutralizačný titer séra. Neutralizačné protilátky po očkovaní a hlavne po preočkovaní môžu u osôb v nízkych titroch perzistovať roky. Vzostup titra v dvojici sér má preto väčšiu výpovednú hodnotu ako nízky titer z jednej vzorky séra. Rekonvalescentné séra dávajú často neutralizačný titer 1:1000 až 1:10 000.

4. Imunofluorescenčný test (IFT)

Metódy identifikácie varioly pomocou imunodifúzie v agarózovom géle a kultivácie na chorioalantoide kuracích embryí sú pomerne zdĺhavé. Preto bola vyvinutá aj diagnostika varioly využívajúca fluorescenčné farbenie, ktorá je menej časovo náročná. Hoci IgG protilátky dokazované imunofluorescenčnou metódou perzistujú u osôb dlhú dobu (niekoľko rokov), nevýhodou tohto testu je jeho relatívne nízka citlivosť. Veľmi často dochádza pri nej ku falošne pozitívnym výsledkom a preto táto metóda nemôže byť rutinnou diagnostickou metódou.

Na dôkaz protilátok voči variole, resp. ortopox vírusom boli vyvinuté aj rôzne ďalšie sérologické metódy, ako sú imunoenzýmová metóda (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), rádioimunoanalýza, precipitačné testy. Všetky ale spomínané testy z rôznych dôvodov sa do rutinnej praxe nezaviedli.

E/ Izolácia a identifikácia DNA vírusu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Na dôkaz prítomnosti vírusu pravých kiahní z PCR metodík najvýhodnejšia je tzv. Real Time PCR. Pri nej sa ako cieľová sekvencia DNA sa využíva fragment hemaglutinínového génu. Primery a sondy potrebné pre priebeh reakcie sú skonštruované špecificky pre detekciu vírusu kiahní, ale pomocou väzobnej sekvencie hemaglutinínového génu je možné detekovať aj prítomnosť ktoréhokoľvek iného vírusu z rodu Orthopoxvirus. Dôkaz vírusu Herpes simplex, či Varicella zoster pri použití týchto primerov a sond nie je možný. Analitická citlivosť reakcie je 5 - 10 kópií väzobnej DNA na vzorku.

Súhrn laboratórnych diagnostických testov u varioly v rôznych štádiách ochorenia

Štádium ochorenia	Materiál na vyšetrenie	Elektrónová mikroskopia	Antigén v léziách (precipitácia/KFR)	Kultivácia (na chorio-allantoide /bunkových kultúrach)	Protilátky v sére (precipitácia, KFR, HI)	PCR (Light cycler)
Preeruptívne	krv		+/-	+/-	-	+
Makulózne a papulózne	nátery	>+	+/-	+	-	+
	sérum				-	+
Vezikulózne	nátery	+	+/-	+<		+
	tekutina z vezikúl	+	+	+		+
	sérum				+/-	+
Pustulózne	nátery	+	+/-	+		+
	tekutina z pustúl	+	+	+		+
	sérum				+	+
Chrasty (krusty)	chrasty	+	+>	+<		+
	sérum				+	+
Neskoré	sérum				+	+
Doba potrebná na vyšetrenie		1 hodina	3-20 hodín	1-3 dni	3-20 hodín	3 hodiny

Vysvetlivky:

KFR - komplement-fixačná reakcia

HI - hemaglutinačno-inhibičný test

PCR - polymerázová reťazová reakcia

LIEČBA

V súčasnosti okrem podpornej liečby neexistuje efektívna liečba proti variole. Základom liečby zostáva liečba symptómov a podávanie antibiotík, na odvrátenie prípadných sekundárnych bakteriálnych infekcií a starostlivosť o chorého. Chorý musí byť stále pod dozorom, aby v delirickom stave neopustil lôžko a neporanil sa, aby u neho nedošlo k zlyhaniu krvného obehu. Na zmiernenie bolestí pri prehĺtaní sa doporučuje podanie anestetík a podávanie tekutej, príp. kašovitej stravy. Ak pacient neprijíma stravu, je potrebná parenterálna výživa infúziami. Prasknuté pľuzgiere sa ľahko infikujú podmienenými patogénnymi baktériami, čím často dochádza k infekcii pokožky a vzniku rôznych flegmón, podkožných abscesov a z nich u vyčerpaného organizmu aj k septikémii. Preto sa chorým hneď od vzniku exantému doporučuje podávať protistafylokokové antibiotiká v obvyklých dávkach. K zvýšeniu celkovej odolnosti sa doporučujú opakované malé transfúzie plazmy. Z ďalších asymptomatických liekov ktoré sa doporučujú použiť pri liečbe varioly sú analeptiká, kardiotoniká, antipyretiká a analgetiká. Vakcína, podaná do 4 dní po expozícii vírusom varioly a ešte pred objavením sa vyrážok má pozitívny účinok. Dokáže uchrániť človeka od infekcii, alebo zmierniť priebeh ochorenia.

Posledné štúdie na bunkových kultúrach a pokusných zvieratách ukázali, že ribavirin a cidofovir podané do 1-2 dní po expozícii vírusom by mohli byť účinné. Použitie týchto liekov je ale limitované, lebo sa môžu podávať len intravenózne a majú silný nefrotoxický účinok. Zatiaľ ich použitie v klinickej praxi sa nedoporučuje.

PROFYLAXIA

Imunizácia

Je potvrdené, že vakcinácia uskutočnená do 4 dní od expozícií vírusom varioly v dostatočnej miere ochráni osobu od infekcii a prípadnej smrti. Vakcinácia obyčajne chráni osobu od varioly najmenej 10 rokov. Dokonca aj keď imunita už poklesla, vakcinovaný pacient vylučuje podstatne menej vírusov a je schopný v oveľa menšej miere prenášať chorobu.

Vakcína varioly obsahuje živé vírusy vakcínie. Súčasné zásoby vakcín sú nedostatočné. V roku 1998 WHO konštatovala, že na svete je približne 90 miliónov dávok vakcín. Podmienky uskladnenia, ako aj účinok týchto vakcín nie sú známe. Pri písaní tejto monografie, viaceré štáty vykonali inventúru svojich zásob a robia testy ich účinnosti. Väčšina existujúcich vakcín je získaná z infikovanej pokožky zvierat (väčšinou teliat alebo oviec) s obsahom fenolu. Vírus na prípravu vakcín (kmeň vírusu vakcínie, tzv. Lister Elestre) pre potreby WHO sa uchováva vo WHO centre pre variolu v Bilthovene v Holandsku. Toto centrum každých 5 rokov aj kontroluje účinok jestvujúcich vakcín. Riadne uskladnené vakcíny za 18 rokov nestratili na svojej účinnosti.

Existujúce vakcíny vykazujú určité vedľajšie nežiadúce efekty a pri ich aplikácii vzniká určité riziko. Na 1 milión osôb sa môže vyskytnúť približne 1000 vážnych prípadov, z toho 14-52 život ohrozujúcich. U určitých ľudí je vakcinácia kontraindikovaná. Je to najmä u tehotných žien, u osôb s ekzémom (10-15 % prípadov smrti), u osôb s poruchami imunity (môže spôsobiť smrť u viacej ako 75 %), osoby s chorobou srdca, osoby s HIV, osoby ktoré používajú imunosupresívne lieky, pri rádioliečbe, pri horúčkových stavoch, chronických ochoreniach a iných. U týchto osôb prichádza do úvahy podanie vakcína imúnneho globulínu.

Pri aktívnej imunizácii sa používa účinná a stabilná očkovacia látka, ktorej titer presahuje 10⁸ pfu (pock forming units) na 1 ml. Počet pozitívnych reakcií po očkovaní musí byť viacej ako 95 %; u revakcinovaných osôb po 10 a viacej rokoch 90 %. Vakcinácia sa vykonáva viacpočetnými vpichmi tzv. bifurkačnou (rozdvojenou) ihlou na ľavom ramene nad úponom deltového svalu. Sterilná bifurkačná ihla sa namočí do očkovacej látky a u prvoočkovaných na ploche o priemere 3-5 mm sa aplikuje 5 vpichov (u osôb už očkovaných 15 vpichov) a to tak, aby sa v mieste vpichov objavili nepatrné stopy krvi. Miesto vpichu sa

nechá zaschnúť. Kým reakcia po očkovaní neodzníe, očkovaná osoba by sa mala vyvarovať ťažkej fyzickej námahy. Samotné

Pri pasívnej imunizácii sa aplikuje vakcína imúnny globulín (Vacciniabulin, Human Antivaccinial Immunoglobulin, Vaccinia Hyperimmune Globuline a ďalšie). Ide o imunoglobulínovú frakciu plazmy, získanú z krvi úspešne revakcinovaných osôb. Tento globulín sa môže použiť hlavne pri post expozičnej profylaxii varioly, súbežne s aktívnou vakcináciou. Na profylaxiu alebo liečbu sa aplikuje intramuskulárne 0,6 ml/kg. Ak sa ho podáva väčšie množstvo (napr. pri 70 kg osobe, 42 ml), dávka sa môže rozdeliť na niekoľko častí a ďalšia sa podá po 24-36 hodinách.

Dezinfekcia a sterilizácia

Treba mať na pamäti, že vírus varioly je pomerne značne odolný voči vonkajším podmienkam. Chrasty pri izbovej teplote si uchovávajú svoju infekciozitu niekoľko rokov. Alastrim vírus, čo je vírus ktorý vyvoláva variola minor formu ochorenia, uschovaný v obálke v skrini v laboratóriu, si uchoval svoju životaschopnosť viacej ako 13 rokov. V aerosóle je pomerne stály, hoci vyššia teplota a vlhkosť nepriaznivo naň vplývajú. Z tohto vyplýva, že dezinfekcia a sterilizácia hrajú dôležitú úlohu pri obmedzení šírenia sa tejto choroby.

V prípade výskytu, alebo manipulácii s týmto vírusom je potrebné vykonávať ako priebežnú, tak aj konečnú dezinfekciu, prípadne sterilizáciu.

V priestoroch, kde bol pacient, alebo predpokladáme že bol prítomný vírus, nastriekaním rozptýlime 0,5 % roztok Persterilu. Priestory sa mechanicky očistia umytím 2 % roztokom chlórámínu, ktorý sa nechá zaschnúť. Oblečenie, ako sú šaty, prádlo, obuv a pod. sa autoklávujú. Pracovný odev, posteľné prádlo, uteráky a iné textílie sa po dobu 30 minút namáčajú do 2-3 % roztoku chlórámínu a potom sa ešte 30 min. varia, alebo autoklávujú. Čalúnený nábytok, koberce a podobné veci sa dezinfikujú formalínovými parami. Podlahy sa minimálne dva krát denne dezinfikujú 2 % roztokom chlórámínu, chlórseptolu, alebo 0,5 % roztokom Persterilu. Roztoky sa nechajú pôsobiť 30 min. Na drevené podlahy môžeme použiť 5 % ajatín, 3 % formalín, alebo 5 % lyzol. Ostatné plochy sa umyjú 2 % roztokom chlórámínu. Nádoby, príbor, nástroje, prístroje sa sterilizujú autoklávovaním, alebo v teplovzdušnom

sterilizátore, alebo sa vyváraajú vo vode s 2 % prísadou uhličitanu sodného (sódy). Ak sa tieto predmety nedajú hneď sterilizovať, tak sa namáčajú na dobu 30 min. do 2 % roztoku chlóraminu, alebo na 10 min. do 0,5 % roztoku Persterilu. Noviny, časopisy, dopisy, toaletné potreby, tuhý odpad, včítane zbytkov potravy sa spaľujú.

Všetky používané dezinfekčné roztoky musia byť čerstvo pripravené. Tam kde je to možné, doporučuje sa používať predmety na jednorazové použitie, ktoré sa po použití spália.

Vo všetkých laboratóriách, ktoré spracovávajú materiál, platia predpisy pre manipuláciu s vysokovirulentným materiálom, (bezpečnostná úroveň BL – 4). Prácu v nich vykonávajú len vyškolení pracovníci s dostatočnou erudíciou a vybavením.

Organizačné opatrenia

Výskyt varioly spôsobuje obrovský problém ako pre zdravotníkov, tak aj pre orgány na ochranu zdravia. Osoby postihnuté touto chorobou by mali byť hospitalizované vo vybratých nemocniciach, ktoré sú na to patrične vybavené. Je vhodné, aby pacienti boli izolovaní v miestnostiach s negatívnym tlakom, s nútenou ventiláciou a filtráciou vzduchu. Tam, kde nemocnice nemajú takéto izolačné možnosti, je lepšie, aby pacienti zostali v domácej zdravotnej starostlivosti. Všetci pacienti a ošetrojúci personál podliehajú osobitnému protiepidemickému režimu. S najväčším rizikom sú pacienti s hemoragickou formou ochorenia. Tí zostávajú bez zistenia diagnózy takmer do smrti, pričom sú extrémne nákazliví. Bol prípad, že pacient s variolou a kašľom hoci aj izolovaný v samostatnej izbe, infikoval osobu na 3. poschodí nemocnice. Osoby by mali byť izolované až do úplného odpadnutia chrást. Všetky osoby ktoré prichádzajú do styku s chorým by mali byť vakcinované. Tí, u ktorých je vakcinácia kontraindikovaná, by mali byť z týchto prác vylúčení. Pacienti, ktorí na variolu zomreli, by mali byť spopolnení. Rakva sa pred vynesением najprv dezinfikuje 2 % roztokom chlóraminu. Od pitiev sa upúšťa. Tie sa vykonávajú len v zvlášť opodstatnených prípadoch.

Pri vykonávaní protiepidemických opatrení sa musia aktívne podieľať aj orgány štátnej správy a štátnej moci. Je potrebné obmedziť styk obyvateľstva žijúceho v postihnutej oblasti, obmedziť väčšie zhromažďovanie sa obyvateľstva, obmedziť cestovanie do a z postihnutej oblasti. Veľmi dôležitá aj zdravotná výchova a informovanosť obyvateľstva. Variola je však eradikované ochorenie a obavy z jeho návratu majú hypotetický a špekulatívny charakter. Vírusy sú spoľahlivo uložené v dvoch laboratóriách s mimoriadne vysokým stupňom bezpečnosti. Tieto laboratóriá sú pravidelne inšpektované zo strany Svetovej zdravotníckej organizácie. Tvrdenia o existujúcej hrozbe pravých kiahní sú v súčasnosti tendenčne spolitizované a pochádzajú najmä z neverifikovaných spravodajských zdrojov. Seriózne vedecké authority zaujímajú k hrozbe návratu varioly skôr skeptické postoje.