



Diagnostika herpetických virů

Přehled diagnostických metod, prováděných v NRL + příručka odběru vzorků.

Sérologie:

Průkaz protilátek proti EBV, HSV, CMV, VZV, HHV6 a HHV8 v séru. Průkaz intrathekálních protilátek proti EBV, HSV, VZV a CMV.

Materiál: 0,2 ml séra nebo likvoru, nebo 1 ml plné krve na vyšetření jednoho agens.

Přímý průkaz CMV:

A) Průkaz antigenemie - detekce antigenu CMV v periferních leukocytech pomocí monoklonálních protilátek proti pp65

Materiál: 5 ml nesrážlivé krve odebrané do EDTA (u malých dětí 3 ml).

Indikace: Průkaz rozvíjející se systemické aktivní infekce, zejména u imunodeficientních pacientů

B) Průkaz virové DNA v krvi, likvoru, BAL, moči, biopsii, autopsii, kostní dřeni, plodové vodě metodou kvantitativní PCR

Materiál: 5 ml nesrážlivé krve odebrané do EDTA (u malých dětí 3 ml) 0,5 ml likvoru, plodové vody, oční tekutiny nebo BAL, nesrážlivá kostní dřev (1-3 ml) nabraná do EDTA, zmražená tkáň z biopsie (nefixovaná, u jehlové biopsie vložená do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku) vše do sterilních dobře uzavřených odběrových nádobek.

Indikace: Průkaz aktivní infekce (primární infekce nebo reaktivace), průkaz postižení orgánů, CNS, oka (retinitidy), průkaz kongenitální infekce, stanovení hladiny virové DNA v krvi.

Poznámka k metodě: Provádíme real-time PCR s citlivostí 500 kopií virové DNA/ml tekutého materiálu. Nízké hladiny virové DNA mohou u neléčených pacientů s prodělanou infekcí přetrvávat v krvi i několik týdnů, v moči i několik měsíců. Metoda je schopna zachytit i asymptomatickou reaktivaci infekce. Vyšetření provádíme nejdéle do jednoho týdne nebo statim po telefonické domluvě.



Přímý průkaz HSV:

A) Izolace HSV z kožní nebo slizniční léze, výtěru z dutiny ústní nebo nosohltanu.

Materiál: Stěr se provádí sterilní štětičkou z čerstvého puchýřku tak, aby se odebralo co nejvíce tekutiny z puchýřku, aniž by se tampon kontaminoval krví. Krční výtěr se provádí setřením zadní stěny nosohltanu a sliznice dutiny ústní. Vyhýbáme se mandlím. Tampon vložený do transportního media pro virologii (na požádání dodáme my nebo kterákoliv virologická laboratoř) transportovat na ledu týž den do laboratoře. Pro vyšetření metodou PCR vložit tampon do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Skladovat při +4°C max. 24 hod.

B) Průkaz virové DNA ve stěru z léze, cervikovaginálním , nebo krčním výtěru, likvoru, krvi, BAL, biopsii metodou PCR

Materiál: Stěr nebo výtěr v 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku (viz výše), 1 ml likvoru, BAL, oční tekutiny, nebo kultivačního média z TK, nesrážlivá krev (3-5 ml) nebo kostní dřev (1-3 ml) nabraná do EDTA, zmrazená tkáň z biopsie (nefixovaná, u jehlové biopsie vložená do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku) vše do sterilních dobře uzavřených nádobek. Transport při normální teplotě, skladování při +4 C 24 hod (biopsie při -20C).

Indikace: Vyšetření stěrů nebo výtěrů je indikováno u pacientů se supektní mukokutánní, genitální nebo oční infekcí. Typizace HSV. Vyšetření krve je vhodné jen u imunodeficientních pacientů s příznaky generalizované infekce nebo u novorozenců. U všech neurologických symptomů je podstatné vyšetření likvoru.

Poznámka k metodě: Provádíme real-time PCR. Metoda diferencuje HSV1 a 2. Citlivost metody je cca 200 kopií virové DNA / 1 ml tekutého vzorku. Vyšetření provádíme nejdéle do jednoho týdne nebo statim po telefonické domluvě.

Přímý průkaz VZV:

A) Průkaz virové DNA v likvoru, stěru nebo tekutině z puchýřku pomocí PCR

Materiál: 1 ml likvoru, BAL, stěr z puchýřku transportovaný v 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku (odběr viz výše), tekutina z puchýřku odebraná injekční jehlou a vstříknutá do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku, nesrážlivá krev (3-5 ml) nebo kostní dřev (1-3 ml) nabraná do EDTA, zmrazená tkáň z biopsie (nefixovaná, u jehlové biopsie vložená do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku) vše do sterilních dobře uzavřených nádobek. Transport při normální teplotě, skladování při +4 C 24 hod (biopsie při -20C).

Poznámka k metodě: Provádíme kvantitativní real-time PCR. Citlivost metody je 200 kopií virové DNA/1 ml



vzorku.

Přímý průkaz EBV:

Průkaz zvýšeného obsahu virové DNA v krvi, kostní dřeni, nebo přítomnosti virové DNA v likvoru, ascitu nebo BAL pomocí kvantitativní PCR.

Materiál: 5 ml (u malých dětí 3 ml) nesrážlivé krve nabrané do EDTA, 1-3 ml kostní dřeneš nabrané do EDTA, 1 ml BAL nebo likvoru. Stěr z aftózní léze u susp. leukoplakie vlasatých buněk, vložený do 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Transport při normální teplotě, skladování max.24 hod. +4 C .

Indikace: Suspektní lymfoproliferativní onemocnění vyvolané EBV (imunodeficientní pacienti), susp.chronická aktivní infekce, leukoplakie vlasatých buněk

Poznámka k metodě: Provádíme real time PCR. Citlivost metody je 100 kopií virové DNA /ml tekutého materiálu. Toto množství může být občas zachyceno v krvi i u zdravých jedinců s latentní infekcí. Pro dif. Dg. Lymfoproliferace je důležitá vysoká hladina, nebo vzestupný trend. Průkaz DNA v likvoru je vhodný u pacientů s probíhající nebo recentně prodělanou aktivní infekcí, nebo imunodeficientních pacientů s neurologickými příznaky. Pro vyšetření biopsií je vhodnější metoda hybridizace in situ, kterou provádějí specializovaná pracoviště klinické patologie.

Přímý průkaz HHV6:

Průkaz virové DNA v krvi , kostní dřeni, likvoru pomocí kvantitativní PCR.

Materiál: 5 ml (u dětí 3 ml) nesrážlivé krve nabrané do EDTA, kostní dřeň nabraná do EDTA, 0,5ml likvoru nebo 1 ml slin do sterilní dobře uzavřené nádoby. Transport při normální teplotě, skladování při +4 C 24 hod.

Poznámka k metodě: Provádíme real time PCR, citlivost metody je 500 kopií virové DNA /ml tekutého vzorku. Pro diferenciální diagnostiku primoinfekce se provádí souběžně průkaz virové DNA v krvi a slinách pacienta. (Při primoinfekci nacházíme pozitivitu v krvi, nikoliv ve slinách, při reaktivaci jsou pozitivní oba vzorky). Vyšetření likvoru je vhodné u pacientů s příznaky neuroinfekce.

Přímý průkaz HHV7 a 8 pomocí PCR:

Nutno domluvit přímo s NRL



Volba vhodné diagnostické metody i zasílaného materiálu závisí na typu pacienta: Proto doporučujeme u komplikovaných a závažných případů předchozí kontaktování NRL.