

# Spalničky: odběr, skladování a transport klinického materiálu, laboratorní diagnostika

## *Measles: collection, storage, and transport of clinical specimens, laboratory diagnosis*

**Radka Limberková**

### KLINICKÝ MATERIÁL [1]

#### 1. VZORKY PRO SÉROLOGII

##### Optimální doba odběru:

- vzorek séra (akutní): co nejdříve od podezření na onemocnění spalničkami (až u 30 % nemocných nemusí být v prvních třech dnech IgM protilátky detekovatelné)
- vzorek séra (rekonvalescentní): za 2 až 3 týdny od odběru akutního vzorku

##### Provedení odběru v ordinaci:

- odběr 7–10 ml venózní srážlivé krve

##### Zpracování srážlivé krve v laboratoři:

- do 24 hodin od odběru separace séra centrifugací (10 minut, 1000 x g)

##### Skladování a transport séra:

- do týdne při teplotě +4 °C
- dlouhodobě při teplotě -20 °C

#### 2. VZORKY PRO VIROVOU DETEKCI

(nasopharyngeální vzorky, moč)

##### Optimální doba odběru vzorků pro virovou detekci:

- co nejdříve, nejpozději do 5. dne od objevení exantému
- nasopharyngeální vzorky mohou být odebírány rovněž před klinickým projevem onemocnění u osob, které byly v kontaktu s nemocným

##### 2.1. Nasopharyngeální vzorky:

###### 2.1.1. Nasopharyngeální/oropharyngeální výtěr

(v našich podmínkách nejčastěji prováděný odběr tohoto typu materiálu)

##### Provedení odběru v ordinaci:

- nejlépe ráno, nalačno, před ústní hygienou
- dvěma sterilními odběrovými tampóny (syntetické jsou vhodnější než bavlněné, které mohou obsahovat látky zpomalující enzymy používané v RT-PCR)
- prvním tampónem se provede důkladný stěr zadní stěny nosohltanu krouživým pohybem (vyhnout se mandlím) a druhým tampónem stěr z obou nosních průduchů
- zalomení obou odběrových tampónů do jedné zkumavky se 2 ml standardního virového transportního média

##### Zpracování výtěru v laboratoři:

- nejdříve jednu hodinu od provedení odběru, optimálně do 24 hodin od odběru
- zkumavka s odběrovými tampóny se krátce protřepe
- tampóny se sterilně vymačkají o okraj zkumavky a zlikvidují jako infekční odpad
- zkumavka se sterilně uzavře

##### 2.1.2. Nosní aspirát

##### Provedení odběru v ordinaci:

- aplikace několika ml sterilního fyziologického roztoku do nosu pomocí injekční stříkačky opatřené jemnou gumovou hadičkou
- aspirát se přelije do zkumavky se 2 ml standardního virového transportního média

##### 2.1.3. Výplach krku

##### Provedení odběru v ordinaci:

- požádáme pacienta o vykloktání malým objemem sterilního fyziologického roztoku
- výplach se přelije do zkumavky se 2 ml standardního virového transportního média

##### Skladování a transport nasopharyngeálních vzorků:

- do 48 hodin od odběru při teplotě +4 °C
- dlouhodobě optimálně při teplotě -70 °C, při přepravě nesmí rozmrznout (na suchém ledu)

##### Poznámka

Místo virového transportního média lze použít buněčné kulturní médium (MEM nebo Hanksův solný roztok) nebo jiný sterilní izotonický roztok (fyziologický roztok, PBS). Přítomnost bílkoviny, např. 1 % hovězího albuminu, 0,5 % želatiny nebo 2 % séra, stabilizuje virus. **Virus bez přítomnosti bílkovin v médiu ztratí při teplotě +4 °C 90–99 % infekčnosti během 2 hodin.**

**VIROVÁ TRANSPORTNÍ MÉDIA JSOU ZDARMA K DISPOZICI V NRL, pouze je nutné si jejich odběr předem telefonicky domluvit na číslech 267 08 2400, 2234, 2412 případně na pohotovostním mobilním čísle 724 362 602.**

##### 2.2. Moč

##### Provedení odběru v ordinaci:

- 10 až 50 ml první ranní moči do sterilní nádoby

##### Zpracování moči v laboratoři:

- centrifugace po dobu 5 až 10 minut, rychlostí asi 1500 otáček za minutu při teplotě +4 °C
- resuspendace sedimentu do 2 ml virového transportního média
- před koncentrační procedurou nesmí být moč zmrazena

##### Skladování a transport moči:

- do 48 hodin od odběru při teplotě +4 °C
- dlouhodobě optimálně při teplotě -70 °C, při přepravě nesmí rozmrznout (na suchém ledu)

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA – legislativa [2]**

Laboratorně potvrzený případ spalniček splňuje alespoň jedno z následujících kritérií:

1. Izolace spalničkového viru z klinického vzorku.
2. Detekce nukleové kyseliny viru spalniček v klinickém vzorku.
3. Přítomnost specifických protilátek proti spalničkovému viru charakteristických pro akutní infekci v séru nebo ve slinách (IgM).
4. Průkaz sérokonverze nebo výrazného, několikanásobného vzestupu hladin specifických spalničkových IgG protilátek vyšetřením dvojice sér.
5. Průkaz vzrůstu hladin preexistujících spalničkových IgG protilátek u reinfekcí.
6. Detekce antigenu spalničkového viru pomocí přímé imunofluorescence v klinickém vzorku odebraném v akutní fázi onemocnění za použití monoklonálních protilátek specifických pro spalničky.

Ke správné interpretaci laboratorních výsledků je třeba brát v úvahu též klinické a epidemiologické údaje včetně statusu očkování. Pokud bylo v posledních 3 až 6 týdnech provedeno očkování, je nutné zvážit vyšetření na nevakcinální virus.

Izoláty viru spalniček izolované z klinického materiálu jsou zasílány do Národní referenční laboratoře pro spalničky, příušnice, zarděnky a parvovirus B19 k dalšímu určování.

Vyšetřující laboratoř u laboratorně potvrzeného případu zajistí zaslání alikvoty séra do Národní referenční laboratoře pro zarděnky, spalničky, parotitidu a parvovirus B19 ke confirmaci. Případ se uzavře až po vyšetření touto laboratoří.

**LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

– izolace viru, interpretace sérologických nálezů [1]

**Izolace spalničkového viru**

- WHO doporučenou buněčnou linií pro izolaci viru spalniček jsou Vero/hSLAM, které byly vytvořeny transfekcí Vero buněk plasmidem kódujícím gen pro lidskou signální molekulu aktivace lymfocytů – human signaling lymphocyte activation marker molecule (hSLAM)

**Detekce IgM protilátek**

- WHO doporučenou metodou pro detekci IgM protilátek je ELISA, její výsledky ukazují velmi dobrou korelaci se schopností detekovat 4 a vícenásobný vzestup IgG protilátek v párových sérech hemaglutinačně inhibičním a plaque neutralizačním testem
- nejcitlivější je pro vzorky odebrané mezi 4. a 28. dnem po objevení exantému
- falešně negativní výsledky: až ve 30% nejsou IgM protilátky detekovatelné během prvních 72 hodin po objevení exantému
- falešně pozitivní výsledky: v důsledku zkřížených reakcí s virem zarděnek, parvovirem B19, EBV a HHV6 v důsledku déle přetrvávajících postvakcinačních IgM protilátek (až 11 týdnů) [3] v důsledku přítomnosti revmatoidních faktorů a virus specifických IgG protilátek v séru (séra je nutné před testováním vysytit RF absorbentem)

**Detekce IgG protilátek a jejich protektivita [4, 5]**

- osoby, které mají v jakémkoli sérologickém testu přítomny specifické spalničkové IgG protilátky jsou považovány za imunní
- v plaque neutralizačním testu se za pozitivní považuje titer  $\geq 1:2$  a odpovídá  $\geq 0,04 \pm 0,02$  IU/ml spalničkových IgG protilátek v EIA

**LITERATURA**

1. WHO: Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection
2. Vyhláška č.473/2008 Sb., o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, ve znění pozdějších předpisů
3. Helfand RF, Gary HE jr, Atkinson WL, Nordin JD, Keyserling HL, Belini WJ. Decline of Measles-specific immunoglobulin M antibodies after primary measles, mumps and rubella vaccination. *Clin Dian Lab Immunol.* 1998; 5(2): 135–138
4. MMWR May 22, 1998/47 (RR-8); 1–57
5. Fischer A, Andrews N, Kafatos G, Nardone A, Berbers G et al. Standardization of measles, mumps and rubella assays to enable comparisons of seroprevalence data across 21 European countries and Australia. *Epidemiol Infect.* (2007); 135: 787–797

MUDr. Radomíra Limberková  
NRL pro zarděnky, spalničky,  
parotitidu a parvovirus B19  
SZÚ - CEM, Praha