

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

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

**Radomíra Limberková**

Epidemiologická situace výskytu spalniček je v České republice dlouhodobě příznivá a obvykle je hlášeno pouze několik převážně importovaných případů onemocnění ročně. V letošním roce propukla lokální epidemie spalniček v Moravskoslezském kraji. V této souvislosti je vhodné připomenout základní fakta, týkající se správných postupů laboratorní diagnostiky, která mohou být užitečná pro zefektivnění monitoringu spalniček ve fázi eliminace tohoto onemocnění.

#### KLINICKÝ MATERIÁL [1]

##### 1. VZORKY PRO SÉROLOGII

###### Optimální doba odběru:

1. vzorek séra (akutní): co nejdříve od podezření na onemocnění spalničkami, nejvyšší výpovědní hodnotu však mají séra odebraná 7. až 10. po výsevu exantému (až u 30 % nemocných nemusí být v prvních třech dnech IgM protilátky detekovatelné)
2. vzorek séra (rekonvalescentní): za 2 až 3 týdny od odběru akutního vzorku, minimálně po 10 dnech

###### 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

###### 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 (VTM)

###### 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)

###### 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)

###### Poznámka

Místo VTM lze použít buněčné kultivační 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.

### 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 vakcinální virus.

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

Vyšetřující laboratoř u laboratorně potvrzeného případu zajistí zaslání alikvoty séra do Národní referenční laboratoře pro zarděnky, spalničky, parotitidu a parvovirus B19 ke konfirmaci. 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 plastidem 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 pro-

tilátek 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

### HISTORIE VAKCINACE

#### Pravidelná jednodávková vakcinace proti spalničkám:

1969 (září): zahájení – děti narozené 1968 starší 10 měsíců  
1970: posun věkové hranice na 12 měsíců věku dítěte

#### Mimoriádná vakcinace dětí očkovaných jednou dávkou (ročníky 1968–1973):

1975 (září) – 1978: II. očkování dětí prvních tříd  
1979–1981: II. očkování dětí osmých tříd

#### Pravidelná dvoudávková vakcinace a posun věkové hranice na 15 měsíců:

1982 – současné očkovací schéma  
I. dávka: od prvního dne 15. měsíce věku dítěte  
II. dávka: za 6 – 10 měsíců od první dávky

#### Očkovací látky:

1969–1987 Movivac  
1987–1994 celoplošné používání vakcíny Mopavac  
březen 1995–2009 celoplošné používání vakcíny Trivivac  
2003 pro samoplátce Priorix (registrace 3. 11. 1999)  
2007 pro samoplátce Priorix-Tetra  
září 2009 celoplošné používání vakcíny Priorix

### PROFYLAKTICKÁ VAKCINACE [6]

Očkování do 72 hodin po expozici spalničkové nákaze může snížit riziko onemocnění o minimálně 90 %. Profylaktická vakcinace je kontraindikovaná u těhotných žen, kvůli zarděnkové složce vakcíny. Z téhož důvodu by žena po vakcinaci neměla 1 měsíc otěhotnět.



**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; March; 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
6. Petráš M, Lesná IK, Manuál očkování 2010. ISBN 978-80-254-5419-0, str.197–252

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