

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

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

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 týdny od odběru akutního vzorku, minimálně za 10 dní

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 vyklotání 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 určování.

Vyšetřující laboratoř u laboratorně potvrzeného případu zajistí zaslání alikvotu 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 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 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 postvaccinačních IgM protilátek (až 11 týdnů) [3]

 v důsledku přítomnosti revmatoidních faktorů a virus specifických IgG protilátek v séru (sérum 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 titr $\geq 1:2$ 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

Mimořádná vakcinace dětí očkovanych 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