

**HYGIENICA
EPIDEMIOLOGICA
ET MICROBIOLOGICA**

1/2000

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica

číslo 1/2000

Doporučené metody ve virologické diagnostice

Praha, leden 2000

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.

Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., Mgr. K. Kánská,
doc. MUDr. J. Kříž, MUDr. J. Mika, RNDr. F. Rettich, CSc.,
A. Svobodová

ISSN 0862-5956

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
číslo 1/2000

Doporučené metody ve virologické diagnostice

Zpracovali: Kolektiv autorů

Vytiskl: Ústav jaderných informací, Praha 5, Zbraslav

Náklad: 450 výt., 56 str., rok vydání 2000

Vydává Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,
telefon redakce (02) 6708 2288

ISSN 0862-5956

Doporučené metody

ve virologické diagnostice.

Vypracoval kolektiv autorů: K.Roubalová¹, J.Horáček², V.Němeček¹,
M.Otavová¹, M.Mrázová¹, M.Brůčková¹, J.Vandasová¹, M.Havlíčková¹,
I.Matyášová¹, J.Schramlová¹, J.Januška³, R.Tachezy⁴, L.Zikmundová⁵

¹ CEM - SZÚ, ² Ústav klin. mikrobiologie LF UK, Hradec Králové, ³ Virologické odd.
KHES, Ostrava, ⁴ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, ⁵ Vidia Diagnostika, Praha.

Obsah

str. č.

Seznam zkratek	2
Adenovirus	3
Astroviry, Coronaviry, Calciviry	6
Cytomegalovirus (CMV)	7
Dengue	10
Virus Epsteinova a Barrova (EBV)	11
Enteroviry (Polio, Coxsackie, ECHO)	13
Hantaviry	15
Virus hepatitidy A (HAV)	16
Virus hepatitidy B (HBV)	17
Virus hepatitidy C (HCV)	19
Virus hepatitidy D (HDV)	21
Virus hepatitidy E (HEV)	22
Herpetický virus 6,7 (HHV6,7)	23
Herpetický virus 8 (HHV8)	25
Herpes simplex virus (HSV)	26
Virus lidského imunodeficitu (HIV)	29
Virus Chřipky A,B	32
Virus Chřipky C	35
Virus klíšťové encefalitidy (VKE)	36
Virus lymfocytární choriomeningitidy (LCM)	38
Papillomaviry (HPV)	39
Virus parainfluenzy 1,2,3	40
Parvovirus B19	42
Poliomavirus	44
Virus příušnic	45
Rotavirus	47
Respirační syncytiální virus (RSV)	48
Virus spalniček	49
Virus varicella zoster (VZV)	53
Virus zarděnek	56

Seznam zkratek:

Ag p24 .. antigen viru HIV o mol.váze 24 kDal.	VCA .. virový kapsidový antigen
ARO ... akutní respirační onemocnění	VKE .. virus klíšťové encefalidity
ATB ... antibiotika (gentamycin, fungizon)	VZV ... virus varicella zoster
AV ... adenovirus	TK ... tkáňové kultury
BAL ... bronchoalveolární laváž	
cDNA ... komplementární DNA	
CMV ... cytomegalovirus	
CNS ... centrální nervový systém	
EA ... časný antigen viru Epstein a Barrové	
EBERs... EB virové časně RNA	
EBV ... virus Epstein a Barrové	
EBNA1...EB virový nukleární antigen 1	
ELISA,EIA ... enzymoimunoassay	
FITC ... fluorescein-isothiokyanát	
HA ... hemaglutinin	
HAV ... virus hepatitidy A	
HBV .. virus hepatitidy B	
HBeAg... časný antigen HBV	
Hbc...kapsidový antigen HBV	
HBsAg... povrchový (s) antigen viru hepatitidy B	
HCV ... virus hepatitidy C	
HDV ... virus hepatitidy D	
HDAg ... antigen viru hepatitidy D	
HEV .. virus hepatitidy E	
HHV6 ... lidský herpetický virus 6	
HHV8 ... lidský herpetický virus 8	
HIT ... hemaglutinačně inhibiční test	
HIV1,2 ... virus lidského imunodeficitu 1,2	
HPV ... lidský papillomavirus	
HSV1,2... virus herpes simplex typu 1,2	
IL-2 ... interleukin 2	
INF ... interferon	
KFR ...komplement-fixační reakce	
LCM ... virus lymfocytární choriomeningitidy	
LCR ... ligázová řetězová reakce	
LDN .. léčebna dlouhodobě nemocných	
LEP ... lidské embryonální fibroblasty	
LMP1 ...latentní membránový protein 1	
NIF ... nepřímá imunofluorescence	
NT .. normální teplota (= 37-38°C)	
NRLnárodní referenční laboratoř	
NRL-AIDS .. NRL pro AIDS	
PCR ... polymerázová řetězová reakce	
Px ...křenová peroxidáza	
RF ... rheumatoidní faktor	
RSV ... respirační syncytiální virus	
RT-PCR ... PCR s reversní transkripcí	
RV ... respirační viry	

Adenovirus

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 celkové protilátky proti AV	KFR	kvantitativně v párových vzorcích séra
	2	1 IgG protilátky proti AV	ELISA	kvantitativně v párových vzorcích séra u dětí do 5 let

Doplňkové: (doplňuje a upřesňuje základní vyšetření)

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgM protilátky proti AV	ELISA	u závažných diagnóz

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
akutní a rekonvalescentní sérum	3-5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8°C 7 dní, dlouhodobě -20°C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace Adenoviru na tkáňových kulturách (klasická)

Princip: Pomnožení viru v tkáňové kultuře (L132, Hep-2, LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace imunohistochemicky pomocí specifické protilátky, typizace virus-neutralizačním testem s typově specifickými antiséry

Kdy použít: Diagnostika a surveillance ARO včetně syndromu dávivého kašle, pneumonií a akutní horečnaté faryngitidy, onemocnění očí, akutní hemoragické cystitidy (v akutní fázi onemocnění -1.-4.den)

Materiál: výtěr nosohltanu, krční výplach, aspirát, BAL, výtěr ze spojivkového vaku, seškrab z rohovky, moč, výtěr z rektu

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
Výtěr z nosohltanu	Sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4 C	Vytřepání do media, homogenizace, pro ELISA sonikace	2-8 C max. 12 hod
Moč	Do steril. nádoby	+4 C	Centrifugace, sediment do odběrového media pro RV, pro ELISA sonikace	2-8 C max. 12 hod
Výtěr spojivkového vaku	Sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4 C	Vytřepání do media, homogenizace, pro ELISA sonikace	2-8 C max. 12 hod
Seškrab z rohovky	Do odběrového media pro RV	+4 C	Homogenizace, pro ELISA sonikace	2-8 C max. 12 hod
Výtěr z rekta	Do odběrového media pro RV	+4 C	Homogenizace, centrifugace, pro ELISA sonikace	2-8 C max. 12 hod

* Stírat krouživým pohybem ze zadní stěny nosohltanu (vyhnout se mandlím). Tampon zalomit do zkumavky s odběr. mediem. Druhým tamponem provést stejným způsobem stěr z obou nosních průduchů a tampon zalomit dostejně zkumavky.

2. Průkaz virového antigenu v klinickém materiálu

Princip: ELISA

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika ARO. .

Materiál: viz 1.

3. Průkaz virového antigenu na TK

Princip: Průkaz replikace viru v TK imunohistochemicky pomocí specifické protilátky značené FITC nebo Px

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika. .

Materiál: viz 1.

4. Průkaz virového antigenu latexovým testem

Princip: Aglutinace latexových částic s navázanou specifickou protilátkou v roztoku za přítomnosti antigenu adenoviru.

Kdy použít: Diagnostika průjmových onemocnění u malých dětí a oslabených jedinců

Materiál: stolice

4. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností

Kdy použít: U závažných diagnóz

Materiál: bronchoalveolární laváž (BAL), stolice, plasma

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
Plasma	5 ml nesrážlivé krve	+4 C	separace plasmy	+4 C 24 hod, po separaci -70 C
Stolice	Do uzavřené nádoby	+4 C	Homogenizace, klarifikace	+4 C 24 hod nebo -70 C
BAL	Do sterilní nádoby	+4 C	Klarifikace	+4 C 24 hod nebo -70 C

Astroviry, Coronaviry, Caliciviry

Sérologické vyšetření: není dostupné

Přímý průkaz viru:

1. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností.

Kdy použít: dif. dg. průjemových onemocnění u kojenců a imunodeficientních pacientů

Materiál: stolice

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
stolice	do uzavřené nádoby	+4°C	homogenizace, klarifikace	při -20°C

Cytomegalovirus

Sérologické vyšetření:

Základní:

alternativa test č.	Název stanovení	metoda	poznámka
1	1 IgG protilátky proti CMV	EIA, NIF	U NIF možná interference virového Fc-receptoru
	2 IgM protilátky proti CMV	EIA, NIF	možná interference RF
2	1 Celkové protilátky proti CMV	KFR	kvantitativně v párových vzorcích séra
	2 IgM protilátky proti CMV	EIA, NIF	možná interference RF

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

test č.	Název stanovení	metoda	poznámka
1	IgA protilátky proti CMV v séru	EIA, IF	vhodné zvláště u malých dětí
2	intrathekální IgG protilátky proti CMV	EIA	u neurologických pacientů

Materiál:

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při normální teplotě	separace séra	2-8 C 7 dní, dlouhodobě -20 C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při normální teplotě	separace plasmy	2-8 C 7 dní, dlouhodobě -20 C
likvor	1 ml likvoru	při normální teplotě		2-8 C 7 dní, dlouhodobě -20 C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace CMV na tkáňových kulturách (klasická)

Princip: Pomnožení viru v kultuře lidských embryonálních fibroblastů (LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace neutralizačním testem, nebo imunohistochemicky pomocí monoklonální protilátky.

Kdy použít: Pro průkaz CMV v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění (potvrzení etiologie onemocnění)

Materiál: moč, výtěr nosohltanu, periferní leukocyty, stolice, likvor, bronchoalveolární laváž

(BAL), biopsie, autopsie

Poznámka: Trvá 7-21 dní.

2. Zrychlená izolace (Shell vial)

Princip: Infekce kultury LEP, naočkování pomocí centrifugace, průkaz časného antigenu CMV (pp72 nebo p68) v jádrech infikovaných buněk pomocí monoklonální protilátky.

Kdy použít: Pro průkaz CMV v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění: diagnostika aktivní infekce u imunosuprimovaných osob, novorozenců a kojenců

Poznámka: Trvá 24-48 hod.

Materiál: viz ad 1.

Materiál:

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
moč	do steril. nádoby	+4°C	úprava osmolarity, přidání antibiotik	+4°C 24 hod
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24 hod
leukocyty	nesrážlivá krev	+4°C	separace leukocytů	zpracování ihned
biopsie, autopsie	do 0,5 ml odběrového media	+4°C	homogenizace v mediu pro TK, přidání antibiotik	zpracování ihned nebo -70 C
stolice	vzorek cca 1 cm	+4°C	homogenizace v mediu pro TK, klarifikace, přidání ATB	zpracování ihned
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod
BAL	do steril. nádoby	+4°C	sedimentace buněk, přidání ATB,	+4°C 24 hod

3. Průkaz antigenu pp65 v polymorfonukleárech (antigenemie)

Princip: Imunohistochemický průkaz strukturálního antigenu, který se při aktivní infekci hromadí v jádrech periferních polymorfonukleárů a mononukleárů.

Kdy použít: Časný průkaz aktivní infekce, rychlá diagnostika CMV infekce, u imunodeficientních pacientů a malých dětí

Materiál: nesrážlivá krev

Poznámka: trvá 8 hod.

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
leukocyty, polymorfonukleáry	5 ml nesrážlivé krve (heparin, EDTA, citrát)	+4°C	separace leukocytů, zhotovení nátěrů	zpracovat ihned, nátěry skladovat v suchu při normální teplotě 3 dny, nebo fixace a -70 C

4. Průkaz virové DNA hybridizací (hybrid capture system, HCS, Murex)

Princip: Hybridizace virové DNA, izolované z leukocytů pacienta, s imobilizovanou genetickou sondou, imunochemická detekce a kvantifikace hybridů

Kdy použít: Časná diagnostika aktivní infekce CMV u imunodeficientních pacientů,

monitorování účinnosti léčby

Materiál: Nesrážlivá krev (odběr, transport a zpracování podle instrukcí výrobce do zkumavek, které jsou součástí diagnostického kitu)

5. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Časná diagnostika aktivní infekce u imunodeficientních pacientů a novorozenců, diagnostika kongenitální infekce, diagnostika infekcí u neurologických pacientů, identifikace CMV, monitorování účinnosti léčby

Materiál: leukocyty, plasma, likvor, kostní dřev, biopsie, oční tekutina, výpotek, BAL, amniotická tekutina, moč

Poznámka: Vysoká citlivost ale nízká prediktivní hodnota. Pro diagnostické účely je nutná kvantifikace nebo kombinace s dalšími metodami přímého průkazu.

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
leukocyty,	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace leukocytů, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4 C týden nebo -70 C
plasma	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace plasmy, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4 C týden nebo -70 C
likvor	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA nebo tepel. denaturace	+4 C týden nebo -70 C
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiolo. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	+4°C 6 hod. nebo -70 C
BAL, výpotek	do steril. nádoby	+4°C	sedimentace buněk, izolace DNA	+4 C 24 hod nebo -70 C
oční tekutina	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4 C 24 hod nebo -70 C
kostní dřev	3 ml punktátu do EDTA	+4°C	separace buněk, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4 C týden nebo -70 C

6. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických (čeleď herpesviridae), nebo imunologických vlastností.

Kdy použít: Diagnostika CMV infekce u imunodeficientních pacientů, akutní infekce CNS, kongenitální a perinatální infekce

Materiál: likvor, plasma, bronchoalveolární laváž (BAL),

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod nebo -70 C
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod nebo -70 C
BAL, výpotek	do steril. nádoby	+4°C	klarifikace	+4°C 24 hod nebo -70 C

Virus Dengue 1-4

Sérologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgG protilátky proti Dengue	EIA	
2	IgM protilátky proti Dengue	EIA	

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Virus Epstein a Barrové (EBV)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	1	IgG protilátky proti VCA	NIF, ELISA	kvantitativně
	2	IgG protilátky proti EBNA1	ELISA	
	3	IgM protilátky proti VCA	NIF, ELISA	možná interference RF
2	1	IgG protilátky proti EA	ELISA (Biotest)	
	2	IgG protilátky proti EBNA1	ELISA	
	3	IgM protilátky proti EA	ELISA (Biotest)	možná interference RF

Doplňkové: (Doplňuje nebo upřesňuje základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgG protilátky proti EA	NIF, ELISA	doplňkové vyšetření k alternativě 1
2	IgA protilátky proti VCA	NIF	dif. dg. karcinomu nosohltanu, diagnostika u malých dětí
3	IgA protilátky proti EA	ELISA	dif. dg. karcinomu nosohltanu
4	IgM protilátky proti EBNA1	ELISA	hlavně u dětí a mladých
5	intrathekální IgG protilátky proti VCA, EBNA	ELISA	dospělých diagnostika onemocnění CNS

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA (PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA termostabilní DNA-polymerázou.

Kvantifikace počtu kopií virové DNA ve vzorku.

Kdy použít: Diagnostika lymfoproliferativních onemocnění u imunodeficientních pacientů, chronické aktivní infekce EBV, neurologických komplikací spojených s EB virovou infekcí, monitorování reakce na léčbu.

Materiál: Plasma, periferní leukocyty, likvor

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty,	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace leukocytů, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
plasma	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace plasmy, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
likvor	do steril. nádobky	+4°C	izolace DNA nebo tepel.denaturace	+4° C týden nebo -70° C

2. Průkaz virové DNA v biopsii.

Princip: Hybridizace in situ, použití cDNA pro EBERs jako sondy.

Kdy použít: Diagnostika lymfoproliferativních onemocnění u imunodeficientních pacientů, diferenciální diagnostika nádorů.

Materiál: biopsie, autopsie.

materiál	transport	zpracování	skladování
biopsie nebo autopsie uzlin, nádorů, lymfoproliferativních ložisek	na suchém ledu	histologické řezy z lymfoproliferativních ložisek (zmrazené), fixace	-70° C

3. Průkaz virových antigenů (EBNA1,2,LMP1,EA,VCA) v biopsii

Princip: Imunohistochemický průkaz virových antigenů pomocí monoklonální protilátky.

Kdy použít: Diagnostika a charakterizace lymfoproliferativních onemocnění u imunodeficientních pacientů, nádorů, hairy cell leukoplakií.

Materiál: viz 2.

Enteroviry (Polio, ECHO, Coxsackie)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 virus-neutralizační test	TK	nutné vyšetření párových vzorků vzorků séra

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace viru na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v kultuře lidských embryonálních fibroblastů (LEP) a opičích buněk (MK2), mikroskopický průkaz cytopatického efektu, identifikace neutralizačním testem.

Kdy použít: Pro průkaz enterovirů v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění, zejména u pacientů s paralytickým onemocněním (akutní chabé parézy, poruchy lícního nervu), komplikacemi po očkování proti polio, akutními infekcemi CNS nebo s průjemným onemocněním, kardiopatií a pleuritid (potvrzení etiologie onemocnění).

Materiál: stolice, likvor, nasofaryngeální výtěr, perikardiální a pleurální výpotek.

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	při -20°C
stolice	do uzavřené nádoby	+4°C	homogenizace, klarifikace, přidání ATB	při -20°C
výpotek	1 ml do steril. nádoby	+4°C		při -20°C
likvor	1 ml likvoru	+4°C		při -20°C

2. Průkaz virové RNA (RT-PCR)

Princip: Reversní transkripce a amplifikace vybraného (nejčastěji rodově společného) úseku RNA pomocí termostabilní DNA polymerázy. Vizualizace produktů reakce elektroforesou nebo imunochemicky.

Kdy použít: Rychlá diagnostika enetrovirových infekcí.

Materiál: Stolicе, likvor, plasma, výtěr z nosohltanu, perkardiální a pleurální výpotek.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	-20° C	homogenizace, izolace RNA	při -20°C, lépe při -70° C
stolice	do uzavřené nádoby	-20° C	homogenizace, izolace RNA	při -20°C, lépe při -70° C
plasma	5ml nesrážlivé krve do EDTA	+4° C do 24 hod	separace plasmы, izolace RNA	po separaci při -20°C, lépe při 70° C
výpotek	do sterilní nádoby	-20° C	izolace RNA	
likvor	1 ml likvoru	-20° C	izolace RNA	při -20°C, lépe při -70° C

3. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností (čel.picornaviridae)

Kdy použít: akutní infekce CNS, průjemová onemocnění u kojenců a oslabených jedinců, komplikace po očkování

Materiál: stolice, likvor, plasma

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
stolice	do uzavřené nádoby	+4° C do 24 hod	homogenizace, klarifikace	zpracovat ihned
plasma	5ml nesrážlivé krve do EDTA	+4° C do 24 hod	separace plasmы,	+4° C do 24 hod
likvor	1 ml likvoru	+4° C do 24 hod		+4° C do 24 hod

Hantaviry

Sérologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgG protilátky proti hantavirům	EIA, NIF	
2	IgM protilátky proti hantavirům	EIA, NIF	možná interference RF

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8°C 7 dní, dlouhodobě -20°C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8°C 7 dní, dlouhodobě -20°C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virového antigenu v klinickém materiálu

Princip: ELISA

Kdy použít: Potvrzení diagnózy

Materiál: Autopsie (plíce, ledviny)

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
autopsie	do uzavřené zkumavky	+4°C	ihned, homogenizace, lyse buněk	-70°C

Virus hepatitidy A (HAV)

Sérologické vyšetření

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda
1	IgM protilátky proti HAV	EIA

Doplňkové: (doplňuje nebo upřesňuje základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda
1	Celkové protilátky proti HAV	EIA

Materiál:

Mteriál	Oběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru: Diagnosticky se neprovádí

Virus hepatitidy B (HBV)

Sérologické vyšetření:

1. Vyhledávací vyšetření (screeningové):

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	průkaz HBsAg	EIA	
2	konfirmační test	neutralizační	u HBsAg reaktivních vzorků

2. Diagnostické vyšetření

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	průkaz HBsAg	EIA	
2	konfirmační test	neutralizační	u HBsAg reaktivních vzorků
3	průkaz HBeAg	EIA	u HBsAg reaktivních vzorků
4	protilátky proti HBe	EIA	u HBsAg reaktivních vzorků
5	protilátky proti HBc	EIA	
6	IgM protilátky proti HBc	EIA	
7	protilátky proti HBs	EIA	kontrola očkování, stav po limitované VHB

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA v krvi.

Princip: a) Amplifikace vybraného úseku virové DNA pomocí termostabilní DNA-polymerázy nebo ligázy (PCR, LCR). Detekce amplifikovaných produktů elektroforezou nebo imunochemicky.

b) Hybridizace virové DNA se značenou sondou.

Kdy použít: U diagnosticky nejasných případů (např. hraniční nekonfirmovatelná HBsAg reaktivita, samotná anti-Hbc reaktivita), pro indikaci chronické VHB k léčbě INF (použit citlivější amplifikační testy), pro monitorování efektu léčby (lze použít i méně citlivé hybridizační testy).

Materiál: plasma, sérum.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra, izolace DNA	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	při NT	separace plasmy, izolace DNA	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Virus hepatitidy C (HCV)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda
	1 celkové protilátky proti HCV	EIA

Doplňkové: (Upřesňuje a doplňuje základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 konfirmační test	imunoblot	u HCV-reaktivních vzorků
	2 serotypování	EIA	před terapií chronických VHC IFN

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové RNA v krvi.

Princip: a) Reversní transkripce a amplifikace vybraného úseku virové RNA pomocí termostabilní DNA-polymerázy nebo ligázy (RT-PCR, isothermická amplifikace). Detekce amplifikovaných produktů elektroforézou nebo imunochemicky. Hybridizace se specifickou sondou (branch-RNA).

Kdy použít: Pro průkaz virémie u anti-HCV pozitivních pacientů, pro monitorování odpovědi na léčbu, pro průkaz časných stadií infekce před vytvořením anti-HCV protilátek, pro průkaz HCV u imunosuprimovaných osob.

Materiál: plasma, sérum.

2. Stanovení genotypu HCV

Princip: RT-PCR a reversní hybridizace.

Kdy použít: U HCV RNA-pozitivních pacientů před léčbou INF.

Materiál: plasma, sérum.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při +4° C do 24 hod.	separace séra, izolace RNA	-20° C, lépe -70° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	při +4° C do 24 hod.	separace plasmy, izolace RNA	-20° C, lépe -70° C

Virus hepatitidy D (HDV)

Sérologické vyšetření

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda
	1 celkové protilátky proti HDV	EIA

Doplňkové: (Upřesňuje a doplňuje základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda
	1 IgM protilátky proti HDV	EIA
	2 průkaz HDAg	EIA

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru: Diagnosticky se v ČR neprovádí

Virus hepatitidy E (HEV)

Sérologické vyšetření

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 celkové protilátky proti HEV(anti-HEV)	EIA	omezená diagnostická hodnota vyšetření, bez možnosti rozlišení akutní a anmnestické protilátkové odpovědi.Sporná specifita stanovení.

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	zpracování	skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru: Diagnosticky se v ČR neprovádí

Herpetický virus 6,7 (HHV6,7)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti HHV6	NIF	kvantitativně
		2 IgM protilátky proti HHV6	NIF	možná interference RF

Doplňkové: Upřesňuje nebo doplňuje základní vyšetření

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 test avidity IgG protilátek	eluce ureou	pro diagnostiku primoinfekcí

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR).

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Průkaz aktivní infekce u imunodeficientních pacientů, neurologických pacientů, hematologických pacientů.

Poznámka: Průkaz virové DNA v leukocytech je nutno kvantitativně nebo semikvantitativně hodnotit.

Materiál: leukocyty, plasma, likvor, kostní dřeň, biopsie, výpotek, BAL

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty,	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace leukocytů, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
plasma	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace plasmy, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiolo. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	+4°C 6 hod. nebo 70° C
likvor	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA nebo tepel.denaturace	+4° C týden nebo -70° C
BAL, výpotek	do steril. nádoby	+4°C	sedimentace buněk, izolace DNA	+4° C 24 hod nebo 70° C
kostní dřev	3 ml punktátu do EDTA	+4°C	separace buněk, izolace DNA	+4°C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C

2. Pomnožení viru v krátkodobé kultuře periferních T-lymfocytů

Princip: Pomnožení viru v krátkodobé kultuře (7-14 dní) periferních lymfocytů pacienta (viz 1.) kultivovaných in vitro v mediu podporujícím růst T-lymfocytů (s fytohemaglutininem a IL-2). Mikroskopický průkaz infikovaných buněk na základě cytopatického efektu.

Identifikace viru pomocí monoklonální protilátky nebo PCR.

Kdy použít: Průkaz viru v akutním stadiu onemocnění (imunodeficientní pacienti, primoinfekce u malých dětí s komplikovaným průběhem).

Poznámka: Citlivost metody je nízká, zachytí se jen velké množství viru.

Materiál: Periferní leukocyty.

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
leukocyty	nesrážlivá krev	+4°C	separace leukocytů	2-8°C do 6 hod

3. Imunohistochemický průkaz antigenu HHV6

Princip: Imunohistochemický průkaz antigenu HHV6 (p41) v biologickém materiálu od pacientů (viz 1) pomocí monoklonální protilátky.

Materiál: biopsie, autopsie, sediment buněk z likvoru nebo BAL

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
biopsie, autopsie	do steril. nádoby	na suchém ledu	příprav histol. preparátu, fixace	-70°C
likvor	do steril. nádoby	+4°C	sedimentace buněk, příprava nátěru, fixace	-70°C
BAL, výpotek	do steril. nádoby	+4°C	sedimentace buněk, příprava nátěru, fixace	-70°C

Herpetický virus 8 (HHV8)

Sérologické vyšetření

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 celkové protilátky proti HHV8	NIF	

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě 20° C -
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě 20° C -

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Diagnostika aktivní infekce u imunodeficientních pacientů, diferenciální dg. Kaposiho sarkomu.

Materiál: leukocyty, plasma, biopsie, autopsie

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty,	nesrážlivá krev (EDTA)	+4° C	separace leukocytů, izolace DNA	+4° C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
plasma	nesrážlivá krev (EDTA)	+4° C	separace plasmy, izolace DNA	+4° C 24 ,po separaci +4° C týden nebo -70° C
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiologického roztoku	+4° C	homogenizace, izolace DNA	+4° C 6 hod. nebo -70° C

Herpes simplex virus (HSV 1,2)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti HSV (1+2)	EIA, NIF	kvantitativně
		2 IgM protilátky proti HSV (1+2)	EIA, NIF	možná interference RF
	2	1 Celkové protilátky proti HSV (1+2)	KFR	nutné vyšetření párových vzorků séra
	3	1 IgG protilátky proti HSV 2	EIA	pro epidemiol. účely
		2 IgG protilátky proti HSV 1	EIA	pro epidemiol. účely

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgA protilátky proti HSV v séru	NIF	vhodné zvláště u malých dětí
2	intrathekální IgG protilátky proti HSV	EIA	u neurologických pacientů

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace HSV na tkáňových kulturách .

Princip: Pomnožení viru v kultuře lidských embryonálních fibroblastů (LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace neutralizačním testem, imunohistochemicky pomocí monoklonální protilátky, nebo PCR.

Kdy použít: Pro průkaz HSV v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění, (exanthematózní onemocnění, lymfadenitis u dětí, gingivostomatitis, onemocnění oka, kongenitální nebo perinatální infekce: diagnostika, potvrzení etiologie onemocnění).

Materiál: stěr z kožních a slizničních lézí, vaginální sekret, výtěr nosohltanu, spojivkového vaku, seškrab z rohovky, biopsie, autopsie.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
stěr z kožní léze	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C
biopsie, autopsie	do odběrového media	+4°C	homogenizace přidání antibiotik	zpracovat ihned
stěr ze spojivky	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C

*Stěr provádíme z čerstvého puchýřku tak, abychom do tamponu nabrali co nejvíce tekutiny z puchýřku. Vyhne se kontaminaci krví.

2. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Diagnostika infekce u neurologických pacientů, u imunodeficientních pacientů, průkaz kongenitální nebo perinatální infekce, diagnostika očních chorob

Materiál: likvor, kostní dřeň, biopsie, oční tekutina, BAL, amniotická tekutina.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty,	3-5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	+4°C	separace leukocytů a plasmu, izolace DNA	+4°C 24 hod
kost. dřeň	3 ml punktátu do EDTA	+4°C	separace buněk, izolace DNA	+4°C 24 hod
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiolog. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	zpracovat ihned
amniot. tekutina	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA nebo tepel. denaturace	+4°C týden
oční tekutina	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C týden
BAL	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C týden

3. Průkaz virového antigenu v biologickém materiálu

Princip:a) Průkaz antigenu v roztoku nebo buněčném lyzátu metodou ELISA.

b) Imunohistochemický průkaz antigenu na nátěrech buněk s použitím monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Kdy použít: Diferenciální diagnostika exanthematických onemocnění, gingivostomatitid, očních onemocnění.

Materiál: Štěr z kožních nebo slizničních lézí (tekutina z puchýřku), výtěr ze spojivkového vaku.

Poznámka: Metoda je méně citlivá než izolace (zachytí pouze větší množství viru), ale výsledek není ovlivněn inaktivací viru.

4. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických či antigenních vlastností (čeleď herpesviridae).

Kdy použít: Diagnostika herpetických infekcí u imunodeficientních pacientů, akutní infekce CNS, kongenitální a perinatální infekce.

Materiál: likvor, plasma, BAL.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod.
plasma	3-5 ml nesrážlivé krve	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod.
BAL	do steril. nádoby	+4°C	klarifikace	+4°C 24 hod.

Virus lidského imunodeficitu (HIV 1,2)

Sérologické vyšetření:

A) Vyhledávací (screeningové) testy:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 protilátky proti HIV 1,2 (celkové Ig)	EIA	reaktivní vzorek nutno konfirmovat v NRL AIDS
	2	1 protilátky proti HIV 1,2 a současné stanovení antigenu p24 HIV 1	EIA	reaktivní vzorek nutno konfirmovat v NRL AIDS
	3	1 protilátky proti HIV1,2 (celkové Ig)	pasivní aglutinace	reaktivní vzorek nutno konfirmovat v NRL AIDS
	4	1 protilátky proti HIV 1,2	rychlé orientační testy	méně spolehlivé, dopor. doplnění klasickou EIA. Reaktivní vzorek nutno konfirmovat v NRL AIDS

B) Konfirmační testy:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 protilátky proti HIV 1,2 (celkové Ig)	EIA	vyšetření minimálně dvěma testy od různých výrobců - provádí pouze NRL AIDS u všech reaktivních vzorků
	2 průkaz antigenu HIV 1 p24	EIA	provádí pouze NRL AIDS u vybraných reaktivních vzorků
	3 průkaz protilátek proti HIV 1,2 (IgG)	imunoblot	provádí pouze NRL AIDS u vybraných reaktivních vzorků

C) Doplnková vyšetření: (Doplňují nebo upřesňují základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 průkaz protilátek proti HIV 1,2 ve slinách	EIA	vhodný pro screeningové vyš. u rizikových skupin, reaktivní nález nutno konfirmovat vyšetřením z krve
	2 protilátky proti jednotlivým antigenům HIV 1	western blot	pro monitorování průběhu infekce u HIV+ pacientů. Provádí pouze NRL AIDS.

Materiál pro vyšetření HIV - protilátek:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
sliny	odběrovou soupravou dle pokynů výrobce	při NT		2-8° C 7-10 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virového antigenu

Princip: Průkaz antigenu p24 HIV 1,2 volného, nebo vázaného v imunokomplexech EIA.

Kdy použít: Diagnostika akutní infekce HIV: HIV-reaktivní dárce krve, novorozenci HIV+ matek, sledování progresu infekce.

Materiál: sérum.

Poznámka: Provádí pouze NRL pro AIDS.

2. Izolace viru na tkáňových kulturách

Princip: Kokultivace lymfocytů HIV+ pacienta s lymfocyty zdravého dárce. Průkaz antigenu p24 v tkáňové tekutině.

Kdy použít: V indikovaných případech- diagnostika akutní infekce HIV, zejména novorozenci HIV+ matek.

Materiál: mononukleární buňky periferní krve.

Poznámka: Provádí pouze NRL AIDS.

3. Průkaz provirové DNA v mononukleárních buňkách periferní krve (PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virového genomu termostabilní DNA- polymerázou. Identifikace amplifikovaného segmentu pomocí hybridizace se specifickou sondou a EIA.

Kdy použít: Průkaz viru u nově identifikovaných případů infekce, novorozenců HIV+ matek, protilátkově negativních kontaktů HIV+ osob.

Materiál: mononukleární buňky periferní krve.

Poznámka: Provádí pouze NRL AIDS.

4. Kvantitativní průkaz virové RNA v plasmě (virová nálož -virus load).

Princip: Reverzní transkripce a amplifikace vybraného úseku virové RNA termostabilní DNA-polymerázou. Kvantifikace amplifikovaných produktů pomocí hybridizace a EIA.

Kdy použít: Sledování progresu infekce, sledování účinnosti antiretrovirové terapie.

Materiál: plasma.

Poznámka: Provádí pouze NRL - AIDS.

5. Průkaz rezistence na antiretrovirové preparáty

Princip: Identifikace virových mutant nesoucích znaky rezistence pomocí PCR a sekvenování vybraných úseků virového genomu.

Kdy použít: Pro zavádění a sledování efektivity antiretrovirové terapie.

Materiál: mononukleární buňky periferní krve.

Poznámka: Provádí pouze NRL AIDS.

Materiál pro přímý průkaz viru:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
mononukleární periferní krve	5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	+4° C	separace buněk (do 6 hod po odb.)	+4° C 3 dny, dále -70° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	+4° C	separace plasmy (do 6 hod po odb.)	+4° C 3 dny, dále -70° C

Virus chřipky A a B

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 protilátky proti chřipce A,B	KFR	kvantitativně
	2	1 IgG protilátky proti HA chřipky A,B	HIT	rozlišení subtypu

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 IgG protilátky proti chřipce A,B	ELISA	u dětí do 3 let věku
	2 IgG protilátky proti chřipce A,B	NIF	konfirmační vyš. u dětí do 3 let
	2 IgM protilátky proti chřipce A,B	ELISA, NIF	u závažných diagnóz pouze v kombinaci se zákl. vyš., jsou li dostupné údaje o začátku onem.

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
akutní a rekonvalescentní sérum	3-5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace Chřipky na tkáňových kulturách (klasická)

Princip: Pomnožení viru v tkáňové kultuře (MDCK), Identifikace hemaglutinací nebo imunohistochemicky pomocí specifické. protilátky.

Kdy použít: Diagnostika a surveillance ARO v akutní fázi onemocnění (1.-4.den) Post-mortem průkaz etiologie onemocnění.

Materiál: výtěr nosohltanu, krční výplach, aspirát, BAL, autopsie (bifurkace trachey, okraj pneumonického ložiska)

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, pro ELISA sonikace	2-8° C max. 24 hod
autopsie	do steril.nádobky	+4° C	příprava suspenze, pro ELISA sonikace	zpracovat ihned
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádobky	+4° C	homogenizace, klarifikace, pro ELISA sonikace	2-8° C max. 24 hod

* Stírat krouživým pohybem ze zadní stěny nosohltanu (vyhnout se mandlím). Tampon zalomit do zkumavky s odběr. mediem. Druhým tamponem provést stejným způsobem stěr z obou nosních průduchů a tampon zalomit do stejné zkumavky.

2. Průkaz virového antigenu na TK

Princip: Průkaz replikace viru v TK imunohistochemicky pomocí specifické protilátky značené FITC nebo Px

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika. .

Materiál: viz 1.

3. Průkaz virového antigenu v klinickém materiálu

Princip: ELISA

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika. .

Materiál: viz 1.

4. Izolace viru chřipky v kuřecím embryu

Princip: Pomnožení viru v amniotickém vaku kuřecího embrya. Identifikace hemaglutinací.

Kdy použít: viz 1.

Materiál: viz 1.

5. Průkaz virové RNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Reversní transkripce a amplifikace vybraného úseku virové RNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: rychlá diagnostika ARO u závažných diagnóz.

Materiál: výtěr nosohltanu, krční výplach, aspirát, BAL, autopsie, likvor.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, izolace RNA	2-8° C max. 24 hod
autopsie	do steril.nádobky	+4° C	homogenizace, izolace RNA	zpracovat ihned
likvor	do steril.nádobky	+4° C	izolace RNA nebo tepelná denaturace	2-8° C max. 24 hod
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádobky	+4° C	homogenizace, izolace RNA	2-8° C max. 24 hod.

6. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností

Kdy použít: post mortem určení etiologie onemocnění (hemoragická tracheitida), akutní infekce CNS, diferenciální diagnostika ARO u imunodeficientních pacientů a závažných diagnóz.

Materiál: autopsie (bifurkace trachey, okraj pneumonického ložiska), likvor, plasma, BAL.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	3-5 ml nesrážlivé krve	+4° C	separace plasmy	2-8° C max. 24 hod
autopsie	do steril.nádobky	+4° C	příprava ultratenkých řezů	zpracovat ihned
likvor	do steril.nádobky	+4° C		2-8° C max. 24 hod
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádobky	+4° C	klarifikace	2-8° C max. 24 hod

Virus chřipky C

Serologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 protilátky proti HA chřipky C	HIT	kvantitativně u dětí do 5 let

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
akutní a rekonvalescentní sérum	3-5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace viru chřipky v kuřecím embryu

Princip: Pomnožení viru v amniotickém vaku kuřecího embrya. Identifikace hemaglutinací nebo imunohistochemicky pomocí specifické protilátky.

Kdy použít: Diagnostika a surveillance ARO v akutní fázi onemocnění (1.-4.den) .

Materiál: Nasofaryngeální výtěr, výplach krku, BAL, aspirát.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr nosohltanu	sterilní štětkou do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media	2-8° C max 24 hod.
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádoby	+4° C	homogenizace, klarifikace	2-8° C max 24 hod

* Stírat krouživým pohybem ze zadní stěny nosohltanu (vyhnout se mandlím). Tampon zalomit do zkumavky s odběr. mediem. Druhým tamponem provést stejným způsobem stěr z obou nosních průduchů a tampon zalomit do stejné zkumavky.

Virus klíšťové encefalitidy (VKE)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti VKE	EIA	možná interference RF
		2 IgM protilátky proti VKE	EIA	
	2	1 Celkové protilátky proti VKE	EIA	možná interference RF
		2 IgM protilátky proti VKE	EIA	
	3	1 Celkové protilátky proti VKE	KFR	možná interference RF
		2 IgM protilátky proti VKE	EIA	

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

Test č.	Název stanovení	Metoda
1	virus-neutralizační protilátky proti VKE	VNT
2	intrathekální IgG proti VKE	EIA
3	intrathekální IgM proti VKE	EIA

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace VKE na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v buněčné kultuře (PS nebo KEB, dif. dg. CV-1, LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace neutralizačním testem, nebo imunohistochemicky, pomocí monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Kdy použít: Pro průkaz VKE v biologickém materiálu od nemocných v akutní fázi onemocnění (akutní infekce CNS).

Materiál: periferní leukocyty, likvor, autopsie.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty	nesrážlivá krev	+4°C	separace leukocytů	2-8° C do 6hod nebo -70°C
likvor	do steril. nádoby	+4°C		2-8° C do 6hod nebo -70°C
autopsie	do odběrového media	+4°C	homogenizace v media pro TK, klarifikace, přidání antibiotik	2-8° C do 6hod nebo -70°C

2. Izolace VKE na sajících myších

Princip: Pomnožení viru v sajících myších po intracerebrální inokulaci.. Identifikace neutralizačním testem, nebo imunohistochemicky na otiscích mozku pomocí monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Kdy použít: viz 1.

Materiál: viz 1.

3. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností (arboviry).

Kdy použít: Akutní infekce CNS.

Materiál: likvor, plasma .

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod

Virus lymfocytární choriomeningitidy (LCM)

Serologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda
	1 celkové protilátky proti LCM	KFR

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Papillomaviry (HPV)

Sérologické vyšetření: není dostupné

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA hybridizací v roztoku

Princip: Hybridizace virové DNA, izolované z cervikálního materiálu s imobilizovanou genetickou sondou, imunochemická detekce a kvantifikace hybridů.

Kdy použít: U pacientek s atypickým cytologickým nálezem (atypical squamose cells of unknown significance-ASCUS/ atypical glandular cells of unknown significance-AGUS), u pacientek nad 35 let s nálezem LSIL (low squamous intraepithelial lesion) a pro sledování pacientek po chirurgickém ošetření (LSIL, HSIL - high squamous intraep. lesion).

Materiál: Cervikální stěr nebo výplach.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
stěr z cervixu	Dacronovým štetečkem do odběr. media (Digene)	Při NT	lyzování buněk denaturace DNA	2-8°C 2 týdny, nebo -20°C
výplach	sedimentace buněk, suspenze v odběr. mediu (Digene)	Při NT	lyzování buněk denaturace DNA	2-8°C 2 týdny, nebo -20°C

2. Průkaz virové DNA v tkáni amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Pro potvrzení přítomnosti papillomavirů v histologických vzorcích (intraepiteliální neoplasie dlaždicového epitelu, kondylomata).

Materiál: biopsie, řezy z parafinových bločků.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiolog. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	+4°C 24 hod
parafinové řezy	řezy 2x20 µm z tkáně fixované neutrálním formalinem	při NT	odstranění parafinu, extrakce DNA	při NT

3. Průkaz virově-specifického antigenu ve tkáni

Princip: Imunohistochemický průkaz pomocí specifické protilátky.

Kdy použít: Pro potvrzení histologického nálezu (koilocyty).

Materiál: Tkáňové řezy z parafinových bločků (tkáň fixovaná neutrálním formalinem) na silikonizovaných sklíčkách.

Virus parainfluenzy 1,2,3

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 protilátky proti Parainfluenze	HIT	kvantitativně v párových vzorcích séra
	2	1 protilátky proti Parainfluenze	NIF	kvantitativně v párových vzorcích séra
	3	1 protilátky proti Parainfluenze	EIA	kvantitativně u dětí do 10 let

Doplňkové: (Doplňuje nebo upřesňuje základní vyšetření)

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1 IgM protilátky proti Parainfluenze	ELISA	jako časná dg pouze u dětí do 2 let věku. Možná interference RF

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
akutní a rekonvalescentní sérum	3-5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace virů parainfluenzy na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v tkáňové kultuře (LLC-MK2), Identifikace hemadsorpcí, hemaglutinací a imunohistochemicky pomocí specifické protilátky

Kdy použít: Diagnostika a surveillance ARO v akutní fázi onemocnění (1.-4.den). Post-mortem průkaz etiologie onemocnění.(bifurkace trachey).

Materiál: výtěr nosohltanu, krční výplach, aspirát, BAL, autopsie.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, pro ELISA sonikace	2-8° C max. 24 hod
Autopsie	do steril.nádobky	+4° C	příprava suspenze, pro ELISA sonikace	zpracovat ihned
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádobky	+4° C	homogenizace, klarifikace, pro ELISA sonikace	2-8° C max. 24 hod

* Stírat krouživým pohybem ze zadní stěny nosohltanu (vyhnout se mandlím). Tampon zalomit do zkumavky s odběr. médiem. Druhým tamponem provést stejným způsobem stěr z obou nosních průduchů a tampon zalomit do stejné zkumavky.

2. Průkaz virového antigenu v klinickém materiálu

Princip: ELISA

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika.

Materiál: viz 1.

3. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností

Kdy použít: akutní infekce CNS, diferenciální diagnostika ARO u imunodeficientních pacientů a kojenců do stáří jednoho roku.

Materiál: likvor, plasma, BAL, autopsie.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
Plasma	3-5 ml nesrážlivé krve	+4° C	separace plasmy	2-8° C max. 24 hod
Autopsie	do steril.nádobky	+4° C	příprava ultratenkých řezů	zpracovat ihned
Likvor	do steril.nádobky	+4° C		2-8° C max. 24 hod
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádobky	+4° C	klarifikace	2-8° C max. 24 hod

Parvovirus B19

Sérologické vyšetření:

Základní:

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgG protilátky proti parvo	EIA	
2	IgM protilátky proti parvo	EIA	možná interference RF

Doplňkové: Upřesňuje serologický nálezn a jeho interpretaci

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	IgG protilátky proti parvo	imunoblot	diagnostika primoinfekce
2	IgM protilátky proti parvo	imunoblot	

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Diagnostika aktivní infekce u imunodeficientních pacientů, diagnostika infekcí u hematologických onemocnění, arthropatií, kardiopatií, průkaz kongenitální infekce, identifikace parvoviru B 19.

Materiál: plasma, kostní dřeň, amniotická tekutina, pupečnicková krev, výpotek.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	3-5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	+4°C	separace plasmy, izolace DNA	+4°C 24 hod
pupečnicková krev	3-5 ml do EDTA	+4°C	izolace DNA	+4°C 24 hod
kost. dřev	3 ml punktátu do EDTA	+4°C	separace buněk, izolace DNA	+4°C 24 hod
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiол. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	zpracovat ihned
amniot. tekutina	do steril. nádobky	+4°C	izolace DNA	+4°C 24 hod
výpotek	do steril. nádobky	+4°C	izolace DNA	+4°C 24 hod

2. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfoloických vlastností.

Kdy použít: Diagnostika infekce u imunodeficientních pacientů, hematologických onemocnění, arthropatií a kardiopatií.

Materiál: plasma, kostní dřev, výpotek,

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
kost. dřev	3 ml punktátu do EDTA	+4°C	sedimentace buněk	+4°C 24 hod
plasma	3-5 ml nesrážlivé krve (EDTA)	+4°C	separace plasmy, izolace DNA	+4°C 24 hod
výpotek	do steril. nádobky	+4°C	klarifikace	+4°C 24 hod

Polyomavirus

Sérologické vyšetření: není dostupné

Přímý průkaz viru:

1. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností.

Kdy použít: Dif. diagnostika onemocnění urogenitálního traktu u imunodeficientních pacientů (průkaz viru BK v moči). Dif. diagnostika onemocnění CNS (progresivní multifokální leukoencefalopatie - průkaz viru JC)

Materiál: moč, likvor

materiál	odběr	transport	skladování
moč	5 ml do sterilní nádoby	+4° C do 24 hod	+4° C do 24 hod
likvor	1 ml likvoru	+4° C do 24 hod	+4° C do 24 hod

Virus příušnic

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti viru příušnic	EIA, NIF	
		2 IgM protilátky proti viru příušnic	EIA, NIF	možná interference RF

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	virus-neutralizační test	TK	konfirmační metoda u nízkých titrů protilátek
2	celkové protilátky proti příušnicím	KFR	nutné vyšetření párových vzorků sér

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace viru příušnic na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v kultuře lidských embryonálních fibroblastů (LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu, identifikace neutralizačním testem, nebo imunohistochemicky pomocí monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Kdy použít: Pro průkaz viru příušnic v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění, zejména u pacientů s meningitidou (potvrzení etiologie onemocnění), orchitidou, pankreatitidou. Odběr materiálu je nutno udělat do 8. dne po začátku onemocnění.

Materiál: moč, likvor, sliny, výtěr z nosohltanu, výplach z krku, biopsie, plasma.

	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
moč	do steril. nádoby	+4°C	úprava pH a osmolarity, přidání antibiotik	zpracovat ihned
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	zpracovat ihned
biopsie, autopsie	do odběrového media	+4°C	homogenizace v mediu pro TK, přidání antibiotik	zpracovat ihned
likvor	do steril. nádoby	+4°C		zpracovat ihned
sliny	do steril. nádoby	+4°C	přidání antibiotik, klarifikace	zpracovat ihned
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	zpracovat ihned
výplach-krk	vykloktat fyziol. roztokem	+4°C	přidání ATB, klarifikace	zpracovat ihned

2. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností (čel. paramyxoviridae).

Kdy použít: Akutní infekce CNS.

Materiál: likvor, plasma .

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod

Rotavirus

Sérologické vyšetření: neprovádí se

Přímý průkaz viru:

1. Průkaz virového antigenu latexovým testem

Princip: Aglutinace latexových částic s navázanou specifickou protilátkou v roztoku za přítomnosti antigenu rotaviru.

Kdy použít: Diagnostika průjemových onemocnění u malých dětí, oslabených jedinců a osob starších 65 let (domovy důchodců a LDN)

Materiál: stolice

2. Průkaz virového antigenu ve stolici ELISA

Princip: ELISA

Kdy použít: viz 1.

Materiál: viz 1.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
stolice	do uzavřené nádoby	+4°C	homogenizace, klarifikace	při -20°C

2. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických vlastností.

Kdy použít: viz 1., dif. dg. průjemových onemocnění u kojenců a imunodeficientních pacientů

Materiál: stolice, viz 1., 2.

Respirační syncytiální virus (RSV)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 celkové protilátky proti RSV	KFR	kvantitativně
	2	1 IgG protilátky proti RSV	ELISA	kvantitativně u dětí do 5 let

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgM protilátky proti RSV	ELISA	jako časná dg pouze u dětí do 2 let věku. Možná interference RF

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
akutní a rekonvalescentní sérum	3-5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě 20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace RSV na tkáňových kulturách (klasická)

Princip: Pomnožení viru v tkáňové kultuře (L132, Hep-2), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace imunohistochemicky pomocí specifické protilátky nebo KFR, ELISA.

Kdy použít: Diagnostika a surveillance ARO, zejména u dětí do 5 let, imunodeficientních pacientů a osob nad 65 let věku, v akutní fázi onemocnění (1.-4.den) Post- mortem průkaz etiologie onemocnění.

Materiál: výtěr nosohltanu, krční výplach, aspirát, BAL, autopsie.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, pro ELISA sonikace	zpracovat ihned
autopsie	bifurkace trachey nebo okraj pneumonického ložiska - do sterilní nádoby	+4° C	příprava suspenze, pro ELISA sonikace	zpracovat ihned
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádoby	+4° C	homogenizace, klarifikace	zpracovat ihned

* Stírat krouživým pohybem ze zadní stěny nosohltanu (vyhnout se mandlím). Tampon zalomit do zkumavky s odběr. mediem. Druhým tamponem provést stejným způsobem stěr z obou nosních průduchů a tampon zalomit do stejné zkumavky.

2. Průkaz virového antigenu na TK

Princip: Průkaz replikace viru v TK imunohistochemicky pomocí specifické protilátky značené FITC nebo Px.

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika. .

Materiál: viz 1.

3. Průkaz virového antigenu v klinickém materiálu

Princip: ELISA

Kdy použít: viz 1., rychlá diagnostika. .

Materiál: viz 1.

4. Průkaz virové RNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Reversní transkripce a amplifikace vybraného úseku virové RNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Rychlá diagnostika u závažných diagnóz (kojenci, imunodeficientní pacienti).

Materiál: viz 1.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, izolace RNA	zpracovat ihned
autopsie	bifurkace trachey nebo okraj pneumonického ložiska - do sterilní nádoby	+4° C	příprava suspenze, izolace RNA	zpracovat ihned
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádoby	+4° C	homogenizace, izolace RNA	zpracovat ihned

5. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických nebo antigenních vlastností (čeled' paramyxoviridae).

Kdy použít: Dif. dg. ARO imunodeficientních pacientů a kojenců.

Materiál: viz 1

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
výtěr z nosohltanu	sterilním detoxik. tamponem do odběrového media pro RV*	+4° C	vytřepání do media, homogenizace, klarifikace	zpracovat ihned
autopsie	bifurkace trachey nebo okraj pneumonického ložiska - do sterilní nádoby	+4° C	příprava ultratenkých řezů	zpracovat ihned
BAL, výplach, aspirát	do sterilní nádoby	+4° C	homogenizace, klarifikace	zpracovat ihned

Virus spalniček

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti spalničkám	EIA, NIF	
		2 IgM protilátky proti spalničkám	EIA, NIF	možná interference RF nebo polyklonální aktivace IS

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Doplňkové: (doplňuje nebo upřesňuje základní vyšetření)

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	2	1 celkové Ig proti spalničkám	KFR	kvantitativně v párových vzorcích séra

Přímý průkaz viru:

1. Izolace viru spalniček na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v kultuře opičích buněk (VERO), mikroskopický průkaz cytopatického efektu, identifikace neutralizačním testem, nebo imunohistochemicky pomocí monoklonální či polyklonální protilátky.

Kdy použít: Pro průkaz viru spalniček v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění (potvrzení etiologie onemocnění). Odběr materiálu je nutno udělat do 3. dne po objevení vyrážky.

Poznámka: Záchytnost (citlivost) metody je nízká.

Materiál: moč, likvor, výtěr z nosohltanu, leukocyty, plasma.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
moč	do steril. nádoby	+4°C	úprava pH a osmolarity, přidání antibiotik	zpracovat ihned
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	zpracovat ihned
likvor	do steril. nádoby	+4°C		zpracovat ihned
leukocyty	nesrážlivá krev	+4°C	separace leukocytů	zpracovat ihned
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	zpracovat ihned
výplach-krk	vykloktat fyziol. roztokem	+4°C	přidání ATB, klarifikace	zpracovat ihned

2. Elektronová mikroskopie

Princip: Visualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických nebo antigenních vlastností (čel. paramyxoviridae).

Kdy použít: Infekce CNS.

Materiál: likvor, plasma .

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod

Virus varicella zoster (VZV)

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
	1	1 IgG protilátky proti VZV	EIA, NIF	u NIF možná interference virového Fc receptoru
		2 IgM protilátky proti VZV	EIA, NIF	možná interference RF
	2	1 Celkové Ig proti VZV	KFR	nutné vyšetření párových vzorků séra

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

test č.	název stanovení	metoda	poznámka
	1 IgA protilátky proti VZV v NIF séru		vhodné zvláště u malých dětí
	2 intrathekální IgG protilátky proti VZV	EIA	u neurologických pacientů

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C
likvor	1 ml likvoru	při NT		2-8° C 7 dní, dlouhodobě -20° C

Přímý průkaz viru:

1. Izolace VZV na tkáňových kulturách

Princip: Pomnožení viru v kultuře lidských embryonálních fibroblastů (LEP), mikroskopický průkaz cytopatického efektu. Identifikace imunohistochemicky pomocí monoklonální protilátky, neutralizačním testem nebo PCR.

Kdy použít: Pro průkaz VZV v biologickém materiálu od nemocných s příznaky onemocnění, (exanthematózní onemocnění, onemocnění oka, infekce u novorozenců).

Materiál: stěr z kožních lézí, výtěr nosohltanu, spojivkového vaku, biopsie, autopsie, seškrab z rohovky.

Poznámka: záchytnost metody nízká.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
stěr z kožní léze	sterilním tamponem do odběrového media*	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C
výtěr z nosohltanu	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C
biopsie, autopsie	do odběrového media	+4°C	homogenizace přidání antibiotik	zpracovat ihned
stěr ze spojivky	sterilním tamponem do odběrového media	+4°C	vytřepání do media, přidání antibiotik	+4°C 24hod. nebo -70° C

*Stěr provádíme z čerstvého puchýřku tak, abychom do tamponu nabrali co nejvíce tekutiny z puchýřku. Vyhneme se kontaminaci krví.

2. Průkaz virové DNA amplifikací (polymerázová řetězová reakce, PCR)

Princip: Amplifikace vybraného úseku virové DNA, izolované z biologického materiálu, s použitím termostabilní DNA polymerázy. Průkaz amplifikovaného segmentu pomocí elektroforézy nebo hybridizace se značenou sondou.

Kdy použít: Diagnostika infekce u neurologických pacientů (průkaz viru v mozkomíšním moku), u imunodeficientních pacientů, průkaz kongenitální nebo perinatální infekce

Materiál: tekutina z puchýřku, likvor, biopsie, stěr ze spojivky, oční tekutina, BAL, perif. leukocyty, amniotická tekutina.

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
leukocyty	nesrážlivá krev (EDTA)	+4°C	separace leukocytů a plasmy, izolace DNA	+4°C 24 hod
biopsie, autopsie	do 0,5 ml sterilního fysiolog. roztoku	+4°C	homogenizace, izolace DNA	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA nebo tepel. denaturace	+4°C týden
oční tekutina	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C týden
tekutina z puchýřků	inj. stříkačkou do 0,5 ml PBS	+4°C	izolace DNA	+4°C týden
amniot. tekutina	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C týden
BAL	do steril. nádoby	+4°C	izolace DNA	+4°C týden

3. Průkaz antigenu v klinickém materiálu

Princip: Imunohistochemický průkaz virového antigenu na nátěrech buněk pomocí monoklonální protilátky.

Kdy použít: viz 1.

Materiál: stěr z léze, BAL

3. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických nebo antigenních vlastností (čel. herpesviridae).

Kdy použít: Akutní infekce CNS, onemocnění u imunodeficientních pacientů, kongenitální a perinatální infekce.

Materiál: likvor, plasma .

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod

Virus zarděnek

Sérologické vyšetření:

Základní:

Alternativa	Test č.	Název stanovení	Metoda	Poznámka
1	1	IgG protilátky proti zarděnkám	EIA	určení imunního stavu při kontaktu
2	1	IgG protilátky proti zarděnkám	EIA	pro diagnostiku
	2	IgM protilátky proti zarděnkám	EIA	doporučuje se "capture" syst.
3	1	celkové protilátky proti zarděnkám	HIT	kvantitativně v párových vzorcích séra

Doplňkové: Upřesňuje serologický nález a jeho interpretaci

test č.	název stanovení	metoda	poznámka
1	Test avidity protilátek	eluce ureou	k rozlišení primoinfekce od reinfekce

Materiál:

Materiál	Odběr	Transport	Zpracování	Skladování
sérum	5 ml srážlivé krve	při NT	separace séra	2-8° C 7 dní, dlouhodobě 20° C
plasma	5 ml nesrážlivé krve	při NT	separace plasmy	2-8° C 7 dní, dlouhodobě 20° C

Přímý průkaz viru:

1. Elektronová mikroskopie

Princip: Vizualizace virových částic v biologickém materiálu pomocí elektronového mikroskopu. Identifikace na základě charakteristických morfologických nebo antigenních vlastností (čel.togaviridae).

Kdy použít: Akutní infekce CNS s podezřením na zarděnkovou etiologii.

Materiál: likvor, plasma .

materiál	odběr	transport	zpracování	skladování
plasma	nesrážlivá krev	+4°C	separace plasmy	+4°C 24 hod
likvor	do steril. nádoby	+4°C		+4°C 24 hod

