

Wymagania dotyczące pobrania i transportu materiału do badań metodą RT-PCR w kierunku zakażeń układu oddechowego wirusem MERS-CoV (hCoV-EMC/2012).

Badania diagnostyczne techniką Real-Time RT-PCR w kierunku zakażeń układu oddechowego wirusem MERS-CoV (hCoV-EMC/2012) wykonywane są w laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH - zgodnie z rekomendacjami WHO (http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/LaboratoryTestingNovelCoronavirus_21Dec12.pdf) .

Formularz zlecenia badań ogólnie dostępny na stronie:

<http://www.pzh.gov.pl/page/index.php?id=35>

Sekretariat Zakładu Wirusologii NIZP-PZH

Tel. 22 54 21 230

Faks: 22 54 21 385

Materiałem do badań w kierunku MERS-CoV są z wyboru:

1. próbki pobrane z dolnych dróg oddechowych takie jak aspiraty przetchnicze (TTA), ewentualnie popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe (BAL).
2. plwocina nieindukowana,
3. wymazy z nosogardła* lub aspiraty z nosogardła*
4. Światowa Organizacja Zdrowia zaleca ponadto pobranie do badań retrospektywnych 2 próbek surowicy/plazmy (pobrane na początku zachorowania oraz po ok. 1-2 tyg.) – do ewentualnych badań w serologicznych.

* *ujemny wynik poszukiwania wirusa MERS-CoV w materiałach z górnych dróg oddechowych (np. w wymazie) nie wyklucza zakażenia. Wskazane jest badanie materiałów z dolnych dróg oddechowych.*

Sposób pobrania, przechowywania i transportu materiału do badań w kierunku hCoV-EMC/2012:

1. **Aspiraty przetchnicze (TTA)** - Pobranie zgodnie z procedurami medycznymi. Do laboratorium należy dostarczyć w ilości 2 – 4 ml w jałowej próbówce - najszybciej jak to możliwe po pobraniu (badanie do 24 godzin), najlepiej w temperaturze chłodzi (5 ± 3°C) (transport na lodzie). Jeżeli próbka będzie przechowywana/transportowana dłużej niż 24 godziny, należy ją zamrozić i dostarczyć do laboratorium w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie (transport na suchym lodzie).
2. **Popłuczyny oskrzelowo – pęcherzykowe (BAL)** – jak powyżej; możliwość niższego stężenia wirusa w próbce w stosunku do TTA, ale materiał nadal polecany;
3. **Plwocina nieindukowana** – przechowywanie i transport jak powyżej; konieczność upewnienia się, że jest to materiał z dolnych dróg oddechowych (badanie mikroskopowe).
 - a. Nie zaleca się indukowania plwociny ze względu na ryzyko zakażenia personelu.
4. **Aspiraty z nosogardła*** – transport i przechowywanie jak powyżej,
 - **Wymaz*** należy pobrać używając zestawów transportowych przewidzianych specjalnie do pobierania materiału klinicznego w kierunku zakażeń wirusowych (wymazówka + podłoże w próbówce). Jałowa wymazówka powinna być wykonana w całości ze sztucznego tworzywa, tzn. patyczek plastikowy oraz wacik wykonany z materiału innego niż wata (dakron, czysta wiskoza, poliester lub sztuczny jedwab), ponieważ stosowanie innych wymazówek powoduje

inhibicję reakcji PCR. Jałowe podłoże (buforowany roztwór soli fizjologicznej – PBS lub płyn Hanks'a albo fizjologiczny roztwór soli) powinno być umieszczone w próbówce wolnej od DNA-az i RNA-az.

- **Uwaga:** Stosowanie innych podłoży transportowych, np. bakteriologicznych uniemożliwia izolację wirusa z próbki. Przesyłanie próbki w nieodpowiedniej próbówce może spowodować uzyskanie fałszywie ujemnego wyniku.
 - Jałową wymazówką należy pobrać głęboki wymaz z gardła i umieścić w próbówce z podłożem (patrz opis powyżej). Próbówkę należy szczelnie zamknąć (w razie potrzeby uciąć patyczek wymazówki), jednoznacznie opisać (data pobrania, imię i nazwisko chorego) i przechowywać w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
 - Próbkę należy przesłać do Laboratorium jak najszybciej, próbka powinna być umieszczona na lodzie w celu zapewnienia temperatury chłodni ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Jeżeli próbka będzie przechowywana/transportowana dłużej niż 24 godziny, należy ją zamrozić i dostarczyć do laboratorium w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie (na suchym lodzie).
5. **Surowica lub plazma** w ilości około 1 ml; bez hemolizy, pobrana jałowo do szczelnie zamykanej próbki. Próbkę należy zamrozić i transportować w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie lub przesłać na lodzie w czasie 24 godzin od pobrania.
- a. Pierwsza próbka surowicy – w fazie ostrej choroby – w trakcie 1 tygodnia od wystąpienia objawów
 - b. Druga próbka surowicy – w fazie ozdrowieńczej – najlepiej 3 lub 4 tygodnie później
6. **Pełna krew** – po pobraniu do pojemnika z EDTA transportowana na lodzie (**bez zamrożenia**) – maksymalnie do 24 godzin od pobrania.
- a. Zalecane jedynie w pierwszym tygodniu zachorowania

Zalecenia dotyczące pakowania materiałów klinicznych znajdują się na stronie:
http://www.pzh.gov.pl/page/fileadmin/user_upload/zaklady/wirusologia/instrukcja.pdf
(poniżej w załączeniu).

Ze względu na potencjalnie zakaźny charakter próbek materiału klinicznego obowiązują następujące zasady pakowania próbek (poziom BSL2):

Pojemniki z materiałem do analizy powinny być zapakowane zgodnie z ogólną zasadą pakowania wymaganą dla czynników biologicznych wywołujących choroby ludzi. Obowiązuje zasada potrójnego opakowania-

A. 1. naczynie zasadnicze zawierające materiał kliniczny,
Naczynie to powinno być:

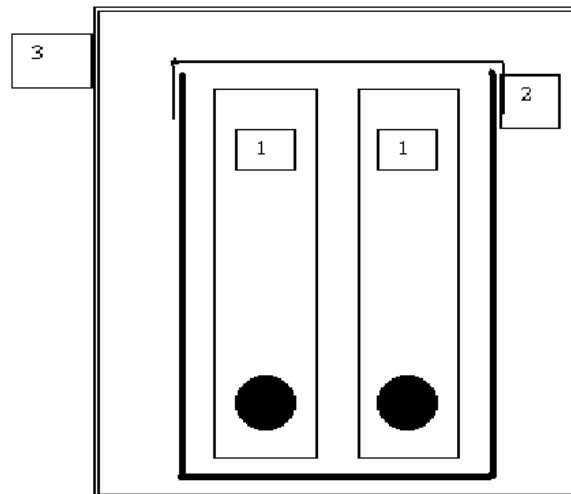
- jednorazowe, z nietłukącego tworzywa sztucznego, odporne na zgniecenie;
- zamykane nakrętką z dodatkową uszczelką zapobiegającą wyciekowi materiału;
- otwierane i zamykane w nieskomplikowany sposób;

2. wtórne opakowanie

Wykonane z odpornych na zgniecenie materiałów i hermetycznie zamknięte. Dopuszcza się możliwość umieszczenia w jednym opakowaniu wtórnym kilku naczyń zasadniczych z materiałem klinicznym pod warunkiem ich jednoznacznego oznakowania. Opakowanie wtórne musi mieć wymiary umożliwiające otwarcie go w boksie laminarnym (wymagane BHP). Przed umieszczeniem w opakowaniu transportowym powierzchnia opakowania wtórnego powinna być wyjałowiona. Dokumentacja dołączona do próbek nie może być umieszczana w opakowaniu wtórnym.

3. opakowanie zewnętrzne = opakowanie transportowe- w przypadku transportu materiałów w warunkach specjalnych (suchy lód, lód) powinno być odporne na dany czynnik. Musi być oznakowane i opisane w sposób identyfikujący klienta i umożliwiający nawiązanie z nim szybkiego kontaktu w przypadkach uszkodzenia próbek czy innych zdarzeń losowych.

Dokumentacje dołączoną do badań należy umieścić oddzielnie w zamkniętych kopertach i przytwierdzonych do opakowania zewnętrznego.



- 1 – próbówka z materiałem do badania
2 – opakownie zbiorcze szczelne
3 – opakowanie zewnętrzne termoizolacyjne