



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه  
حوزه معاونت بهداشتی

گرد آوری و تهیه :

جدیدیان

واحد امور آزمایشگاهها

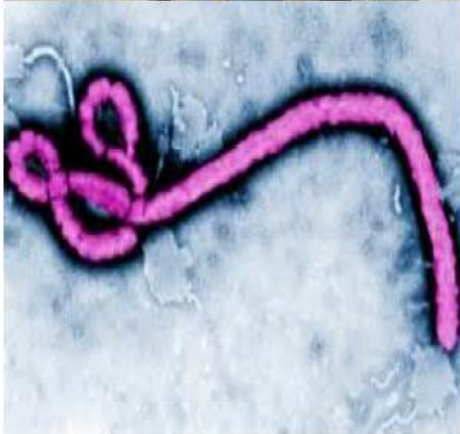
بهمن 93

دستورالعمل آزمایشگاهی نحوه نمونه گیری و نوع نمونه و  
چگونگی انتقال موارد مشکوک بیماریهای تحت مراقبت و موارد

بحران

آبان ۱۳۹۳

## راهنمای مراقبت آزمایشگاهی ایبولا



وزارت بهداشت درمان آموزش پزشکی

معاونت بهداشت

مرکز مدیریت بیماریهای واگیر

## تشخیص آزمایشگاهی در مراحل مختلف بیماری ایبولا:



در مرحله حاد بیماری ایبولا، گردش **ویروس در خون** بیماران (ویرمی) دیده می شود اما با بهبود علائم بالینی و همزمان با پیدایش آنتی بادی در خون بیماران، ویرمی نیز از بین می رود. کشت ویروس نیز در مراحل اولیه بیماری مثبت می گردد. روش RT-PCR یا تعیین آنتی ژن ویروس روش عملی حساسی است که در تشخیص بیماری قابل استفاده می باشد. علاوه بر تیترا بالای ویروس در خون بیماران، باید اشاره نمود که میزان ویروس موجود در **فیبروبلاست ها و سایر ساختارهای پوست** مبتلایان نیز بالا می باشد. در دوران نقاهت ممکن است تا ۸ هفته بعد نیز بتوان ویروس را از مایع منی جدا نمود و در موارد یوئیت دیررس نیز توانسته اند ویروس را مایع اتاکن قدامی چشم جدا نمایند.

قبل از آنکه بیمار بتواند رابطه جنسی محافظت نشده (بدون استفاده از کاندوم) داشته باشد باید از منفی شدن کشت مایع منی با ارسال نمونه به آزمایشگاه مطمئن گردید.

نکروزهای منطقه ای مهمی در بسیاری از ارگانهای بدن رخ می دهد مانند نکروزهای فولیکولر در غده های لنفاوی و همچنین نکروزهای کبدی، که در این نکروزها می توان پارانشیم بافت درگیر شده، سلول های دفاعی تک هسته ای، سلول های اندوتلیال و آنتی ژن های ویروس درون آنها را یافت نمود.

**از روز ۸ تا ۱۲ بیماری (هفته دوم)، آنتی بادی ها شکل می گیرند و تغییرات سرمی رخ می دهد.** در مراحل اولیه دوران نقاهت مثبت شدن **IgM** ارزش تشخیصی دارد اما **IgG** وقتی با روشهای غیرمستقیم تعیین آنتی بادی فلورسانس انجام شود دارای نتایج مثبت کاذب بوده و باید با روشهای دقیقتری مورد تایید قرار گیرد.

### توصیه هایی برای جمع آوری ، حمل و نقل و آزمایش نمونه بیماران مشکوک به ایبولا

توصیه می شود هنگام تهیه و جمع آوری نمونه ها حداقل از وسایل محافظتی ذیل استفاده گردد:

- محافظ کامل صورت یا
- عینک مخصوص به همراه ماسکی که دهان و بینی را کامل بپوشاند،
- دستکش،
- گان غیر قابل نفوذ یا ضد آب
- *\*(در برخی موقعیت ها تجهیزات محافظت شخصی بیشتر از این مقدار نیز مورد نیاز است).*

توصیه می شود هنگام **انجام روش آزمایشگاهی** بررسی نمونه از وسایل محافظتی ذیل استفاده گردد:

- محافظ کامل صورت
- ماسکی که دهان و بینی را کامل بپوشاند،
- دستکش،
- گان غیر قابل نفوذ یا ضد آب
- درجه امنیت زیستی سطح ۳ و بیشتر



### احتیاطات در زمان تهیه نمونه:

۱. تمامی کادر درمانی و آزمایشگاهی که در تهیه نمونه و جابجایی آن شرکت داشته و ممکن است دچار آلودگی با عوامل بیماریزای قابل انتقال از راه خون و سایر ترشحات بیمار گردند، باید هر مایع و ترشحاتی از بدن را باید آلوده فرض نمایند و موازین احتیاطی را به دقت رعایت نمایند و از وسایل حفاظت فردی مانند دستکش به درستی استفاده نمایند.
۲. هر فردی که از بیمار مشکوک به ایبولا نمونه تهیه می نماید باید اقدام به پوشیدن حداقل وسایل شامل دستکش، گان ضدآب (water resistant)، محافظ صورت یا عینک و ماسک (پوشاننده بینی و دهان) نماید. در شرایط ویژه ممکن است وسایل حفاظتی بیشتری مانند چکمه و ... نیز لازم گردد.
۳. برای جابجایی نمونه ها از لوله های نشکن دارای درب مطمئن باید استفاده گردد و آنرا درون لایه جاذب و پایدار دیگری قرار داد تا جلوی نشت احتمالی آن گرفته شود.

### کار کردن با نمونه ها برای تست های آزمایشگاهی روتین (نه با هدف تشخیص ایبولا)

تست روتین آزمایشگاهی شامل آزمایشات شیمیایی معمول، هماتولوژی و سایر تست های آزمایشگاهی برای تشخیص و درمان بیماران است. موازین احتیاطی ذکر شده در بالا محافظت مناسبی برای کارکنان بهداشتی که بر روی نمونه های بیماران مشکوک به ایبولا تست انجام می دهند فراهم می کند. این موازین احتیاطی شامل جنبه های امنیتی برای سطوح و محیط و همچنین تجهیزات محافظت فردی است.

ضد عفونی کننده های رایج که برای آلودگی زدایی محیط آزمایشگاه (روی کابینت و سطوح) و ابزار آزمایشگاهی استفاده می شود، برای غیرفعال کردن ویروس های پوشش دار مثل ایبولا، هپاتیت C و ویروس ایبولا نیز کاربرد دارند.

### زمان جمع آوری نمونه ها برای تست ایبولا

ویروس ایبولا تنها پس از ظهور علائم بالینی به خصوص تب در خون قابل تشخیص است. زمان لازم برای آنکه ویروس به سطح قابل تشخیص برسد ممکن است تا ۳ روز پس از علائم بالینی طول بکشد. ویروس به طور کلی با تست Real-Time PCR از ۱۰-۳ روز پس از بروز علائم بالینی قابل تشخیص است اما در برخی ترشحات (مانند مایع منی) تا

ماه ها باقی می ماند. بهتر است نمونه ها زمانی گرفته شود که بیمار "علامتدار" مشکوک به ایبولا به مراکز بهداشتی درمانی مراجعه می کند.

اگر از شروع علائم بیمار، کمتر از ۳ روز گذشته باشد، نمونه گیری مجدد برای رد کردن تشخیص ایبولا لازم است.

#### نمونه های ارجح برای تشخیص ایبولا

- حداقل حجم ۴ میلی لیتر (چهار سی سی) خون کامل که در لوله های جمع آوری پلاستیکی (دارای EDTA یا سیترات) محافظت شده باشد قابلیت ارسال برای تشخیص ایبولا را دارند.
- "نمونه هایی که در لوله های هیپارینه نگهداری شده اند برای ارسال مناسب نیستند".
- نمونه ها باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد یا شرایط انجماد نگهداری شوند.
- برچسب زنی استاندارد باید برای هر نمونه انجام شود.
- لازم است آزمایشات درخواستی مورد نظر تنها با "فرم های ارسال نمونه" مورد تایید وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ارسال شوند.

#### تست تشخیصی برای ایبولا:

**تشخیص عفونت های حاد** با استفاده از روش **Real-Time PCR** تایید می شوند. تست سرولولوژیک برای آنتی بادی های IgG و IgM تنها در شرایط خاص و برای **پایش پاسخ ایمنی** در بیماران مبتلا به ایبولا انجام می شوند.

- از آنجاکه تب لاسا نیز در برخی نواحی غرب آفریقا اندمیک بوده و ممکن است علائمی مشابه مراحل اولیه ایبولا داشته باشند لذا **تست های تشخیصی تکمیلی باید برای رد کردن تب لاسا** در بیمارانی که آزمایش ایبولا در مورد ایشان منفی گزارش گردیده است انجام شود.

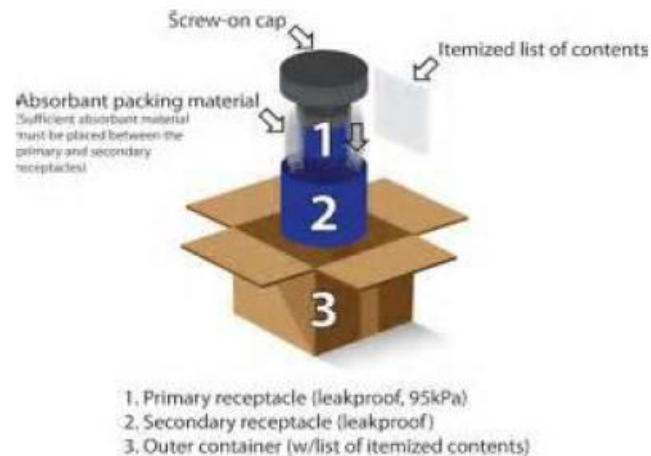
### حمل و نقل نمونه ها

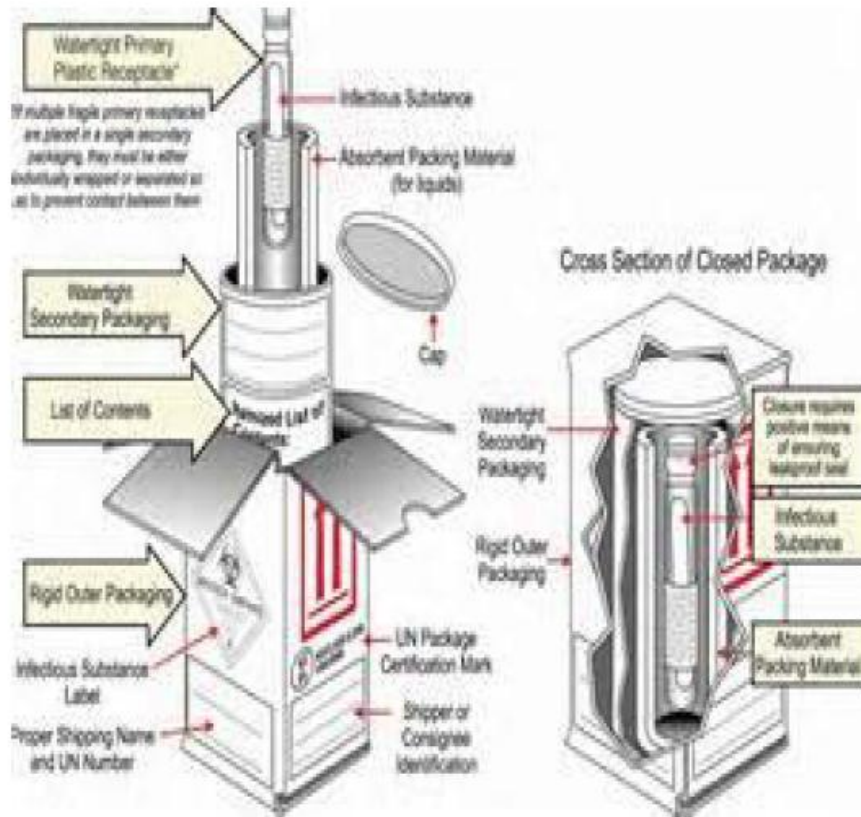
نمونه ها باید در محفظه های ثانویه ضد نشت مخصوص برای انتقال قرار داده شوند. برای کاهش خطر نشت یا شکستن از ظروف شیشه ای استفاده نشود.



### بسته بندی و ارسال نمونه های بالینی به آزمایشگاه:

- نمونه های جمع آوری شده باید به گونه مناسب بسته بندی و ارسال شود و از باز کردن نمونه های جمع آوری شده یا قسمت نمودن آنها در لوله های متعدد خود داری شود.
- نمونه های برای ارسال باید طبق سیستم بسته بندی سه لایه آماده شوند که شامل ظرف اولیه (ظرف نمونه قابل بسته شدن) که با مواد جذبی پوشیده شده، محفظه دوم (خدآب و غیرقابل نفوذ) و لایه آخر برای ارسال می باشد.







**روند ارسال نمونه به آزمایشگاه:**

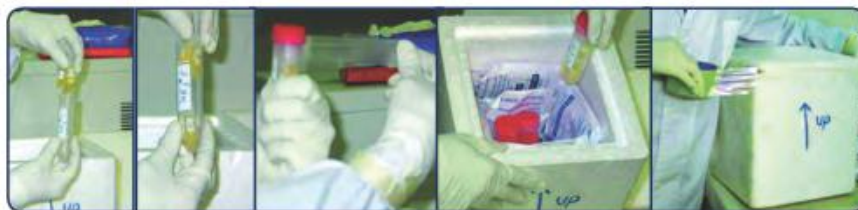
۱. پیش از برقراری تماس با آزمایشگاه، بیمارستان‌ها باید بلافاصله سلسله مراتب بهداشتی منطقه‌ای را برای اطلاع رسانی مورد مشکوک به سطوح بالاتر و درخواست ارسال نمونه را دنبال نمایند.
۲. در آزمایشگاه سطح ملی، **هیچ نمونه‌ای**، بدون تایید مراکز بهداشت استان و مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر پذیرفته نمی‌شود.
۳. **لازم است اطلاعات مربوط به نام ارسال کننده، نام بیمار، آزمایش مورد درخواست، تاریخ نمونه‌گیری، کد نمونه و نوع نمونه ارسال شده درج شود.**
۴. فرم‌های مصوب ارسال نمونه، باید همراه نمونه باشد.
۵. روش نگهداری نمونه در بیرون جعبه درج شود: یخچال یا فریزر.
۶. **گزارش خطرات شغلی:** مواجهه بالقوه با خون، مایعات بدن و سایر مواد عفونی بیمارانش مشکوک به ایبولا، باید فوراً به مرکز بهداشت شهرستان، استان و مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر گزارش شود.
۷. حداقل نمونه لازم برای بررسی بیمار مشکوک به بیماری ایبولا ۴ سی سی خون است که در لوله پلاستیکی قرار داده شده باشد.
۸. از ارسال نمونه‌ها در لوله شیشه‌ای یا لوله‌های هپارینه جدا خودداری شود. ترجیحاً نمونه خون در لوله آزمایش پلاستیکی دارای EDTA ارسال گردد اما در شرایط اضطرار می‌توان از لوله‌های سیتراته نیز استفاده نمود.
۹. نیازی به جدا سازی و حذف سرم از نمونه خون بیمار نمی‌باشد. باید نمونه بلافاصله بعد از تهیه در سرمای ۲ الی ۸ درجه سانتیگراد قرار داده شده و در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال شود. **حفظ زنجیره سرما در زمان ارسال مهم است.** نگهداری کوتاه مدت نمونه تا زمان ارسال به آزمایشگاه مجهز باید در سرمای صفر تا ۴ درجه انجام شود.
۱۰. تمام نمونه‌ها باید دارای برچسب مشخصات باشند و به همراه فرم ارسال نمونه به آزمایشگاه مجهز توصیه شده توسط مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر ارسال گردد. نمونه منفی ایبولا باید از نظر تب لاسا نیز در آزمایشگاه بررسی گردد.
۱۱. در زمان ارسال نمونه‌ها باید از باز نمودن مجدد درب نمونه‌ها یا تقسیم آنها در چند لوله دیگر خودداری شود. نمونه‌ها باید بدرستی بسته بندی شده و با روش صحیح توصیه شده ارسال گردند.
۱۲. قبل از ارسال نمونه‌ها باید بیمارستان‌ها و مراکز درمانی در ابتدا با مسئولین بهداشت شهرستان و استان خود جهت گزارش مورد مشکوک و کسب مشورت در مورد نمونه‌گیری و ارسال آن تماس حاصل نمایند. مراتب توسط مسئولین استانی بلافاصله به مرکز مدیریت بیماری‌ها گزارش فوری گردد. آزمایشگاه از پذیرفتن نمونه‌هایی که بدون گزارش و مشورت و بدون تایید و فرم مخصوص مرکز بهداشت استان باشند معذور است.

۱۳. بر روی فرم همراه نمونه، نام مرکز بهداشت ارسال کننده، نام بیمار، کد اختصاص داده شده به بیمار، نوع نمونه، تاریخ نمونه گیری، آزمایش مورد درخواست ذکر شده باشد. بر روی برچسب لوله کد بیمار و نام بیمار ذکر گردند.
۱۴. نمونه ها باید در بسته بندی سه لایه مخصوص مواد بسیار عفونی و به صورت کاملا بهداشتی ارسال گردند. لایه اول جاذب مایعات نشستی می باشد و لایه دوم آب بندی شده و غیرقابل نشست است.

## CCHF دستور العمل نمونه گیری

### نحوه تهیه و ارسال نمونه

از افراد مورد نظر ۱۰ میلی لیتر خون با رعایت کلیه احتیاطات بهداشتی لازم، نظیر استفاده از دو جفت دستکش مخصوص آزمایشگاهی، عینک، روپوش و... گرفته شود. در هنگام خونگیری دقت شود که از هرگونه تماس با خون یا مواد بیولوژیک فرد بیمار با بدن (به خصوص چشم‌ها، مخاط، دهان و بینی) نمونه‌گیر، جلوگیری گردد. پس از جداسازی سرم (مطابق تصاویر) ابتدا سرم‌ها را به لوله‌های کرایوتیوپ پلاستیکی منتقل نموده و درب آنرا محکم بسته و سپس به وسیله پارافیلیم درب آن‌ها پوشانده شده و پس از درج کد بیمار مربوطه در پشت این لوله‌ها با مارکرهای Water resistance لوله‌ها را در یک لوله بزرگتر فالکون ۵۰ CC پلاستیکی قرارداده و درب آن را محکم بسته و به وسیله پارافیلیم نیز پوشانده شود سپس نمونه‌ها را در Vaccine carrier در مجاورت کیسه یخ (Ice bag) قرارداده و در زنجیره سرد در اولین فرصت همراه با فرم‌های مربوطه، به آزمایشگاه آربوویروس و تب‌های هموراژیک ویروسی انستیتو پاستور ایران ارسال گردد.



### توصیه‌های مرتبط به احتیاطات بهداشتی در آزمایشگاه

رعایت کلیه پروتکل‌های مربوط به کار با ویروس‌های تب‌های هموراژیک ویروسی در آزمایشگاه الزامی می‌باشد، نظیر استفاده از دو جفت دستکش‌های مخصوص آزمایشگاهی، استفاده از گانهای مخصوص، استفاده از ماسک، عینک و کلاه ایمنی (محافظ صورت)، برقراری فشار منفی (Negative pressure) در محل آزمایشگاه مربوطه، استفاده از هودهای بیولوژیک مربوطه، رعایت کلیه جوانب و شرایط ضدعفونی در آزمایشگاه و رعایت Biosafety مربوطه و...

## دستورالعمل نمونه گیری از مورد مشکوک به کورونا ویروس

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی - راهنمای مراقبت بیماری تنفسی کورونا ویروس - نسخه خرداد ۱۳۹۳

### نمونه گیری از بیماران:

- ۱- نمونه های ترجیحی مورد نیاز آسپیراسیون از تراشه (DTA=DEEP TRACHEAL ASPIRATE) یا لاواژ ترشحات برونش (BAL) می باشد. نمونه خلط در درجه بعدی قرار میگیرد. سواب بینی و سواب حلقی در درجه سوم قرار دارند و در صورت عدم امکان تهیه نمونه های تحتانی تر تنفسی (خلط، BAL، DTA) می تواند به تشخیص بیماری کمک نماید.
- ۲- از کلیه بیماران بستری در بخش با تشخیص اولیه پنومونی و مشکوک به کورونا ویروس که دارای سابقه مسافرت به کشورهای دارای گردش ویروس می باشند (در حال حاضر کشورهای شبه جزیره عربستان) یا در تماس با افراد محتمل یا قطعی مبتلا به کورونا ویروس بوده اند نمونه گیری مناسب از نظر بررسی کورونا ویروس بعمل می آید (با تعریف مراقبتی بیماری منطبق باشند).
- ۳- بیمارانی که در عرض ۱۴ روز بعد از بازگشت از کشورهای فوق الذکر دچار بیماری تنفسی شدید شده و فوت شده اند اما هیچگونه نمونه تنفسی از ایشان تهیه نشده است قبل از تدفین جسد (خاکسپاری)، با هماهنگی پزشکی قانونی تحت نکروپسی قرار گرفته و نمونه بافتی ریه بیمار تهیه و به آزمایشگاه کشوری رفرانس ارسال گردد.

### تهیه نمونه و جابجایی آن:

موازین دستورالعمل کنترل عفونت را هنگام تهیه نمونه باید بدرستی رعایت نمود. بر اساس اطلاعات موجود بیشترین تیترا ویروس در نمونه های ترشحات تنفسی تحتانی (خلط، آسپیره ترشحات نای، شستشوی ترشحات برونش) بدست می آید. ترشحات فوقانی دستگاه تنفس نیز توصیه می شوند علی الخصوص هنگامی که امکان تهیه نمونه از ترشحات تحتانی وجود نداشته باشد.

- در حال حاضر در صورت شک به این بیماری باید دو نمونه سرم نیز از بیمار تهیه شود و تا زمانی که امکان انجام آزمایشات سرولوژیک فراهم می شود در زنجیره سرما (برودت منهای ۷۰ درجه) نگه داری گردد (این دو نمونه باید به فاصله حداقل ۳ هفته از همدیگر تهیه شده باشند و نمونه اول در هفته اول بیماری تهیه می گردد). زمانی که از شروع بیماری بیش از ۲ هفته گذشته باشد می توان سطح آنتی بادی را در بدن اندازه گرفت.

- بهترین زمان برای اخذ نمونه تنفسی ظرف ۷ روز اول بیماری و قبل از تجویز داروهای ضدویروس است.
- در صورت عدم ارسال نمونه ها در طی ۷۲ ساعت اولیه (ترجیحا ۲۴-۴۸ ساعت اولیه) ضروری می باشد نمونه ها در برودت منهای ۷+ درجه سانتیگراد نگهداری گردد و در زمان انتقال به آزمایشگاه کشوری فرانس از تانک ازت استفاده شود.
- آزمایشگاه کشوری فرانس کورونا ویروس مستقر در آزمایشگاه ملی انفلوانزا واقع در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد.

نمونه ها باید در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شود (ترجیحا در عرض ۲۴ الی ۴۸ ساعت). وقتی احتمال تاخیر در رساندن نمونه ترشحات تنفسی یا سرم بیمار به آزمایشگاه وجود دارد توصیه می شود نمونه ها را در برودت منهای ۷+ درجه نگهداری نمود.

در جدول زیر نام نمونه هایی که می توان از بیمار مشکوک تهیه نمود و اقدامات مورد نیاز برای ذخیره سازی و انتقال آنها ذکر شده است.

انواع نمونه هایی که از بیماران مشکوک به کورونا ویروس تهیه می گردد:

نوع نمونه	محیط انتقال	انتقال به آزمایشگاه	گروه بندی از نظر خطر انتقال نمونه عفونی	توضیحات
خلط (خلطی که بطور طبیعی ایجاد شده و تهیه گردد)؛ جمع آوری خلط القا شده می تواند باعث آلوده شدن کادر درمانی مسئول گردد.	نیاز نیست	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد نمونه ها در برودت منهای ۷۰ درجه نگهداری گردد	مواد بیولوژیک، گروه B	مطمئن شوید که نمونه از ترشحات تحتانی تنفسی تهیه شده است
ترشحات برونشها و کیسه های هوایی (Bronchoalveolar lavage)	نیاز نیست	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد نمونه ها در برودت منهای ۷۰ درجه نگهداری گردد	مواد بیولوژیک، گروه B	هرچند ممکن است نمونه تا حدی رقیق شده باشد اما کماکان بهترین نمونه است
ترشحات نای (Tracheal aspirate)	نیاز نیست	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد نمونه ها در برودت منهای ۷۰ درجه نگهداری گردد	مواد بیولوژیک، گروه B	
ترشحات حلق و بینی (Nasopharyngeal aspirate)	نیاز نیست	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد نمونه ها	مواد بیولوژیک، گروه B	

		در پرودت منهای ۷۰ درجه نگهداری گردد		
از این نوع نمونه گیری ویروس را جدا نموده اند	مواد بیولوژیک، گروه B	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری و منتقل شود (سرمای یخچال).	محیط انتقال ویروس نیاز است	سواب ترکیبی گلو و بینی ( Combined nose/throat )
	مواد بیولوژیک، گروه B	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری و منتقل شود (سرمای یخچال).	محیط انتقال ویروس نیاز است	سواب حلق و بینی ( Nasopharyngeal swab )
	مواد بیولوژیک، گروه B	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد نمونه ها در پرودت منهای ۷۰ درجه نگهداری گردد	محیط انتقال ویروس یا محیط سالین نیاز است	بیوپسی یا اتوپسی بافتی شامل بافت ریه
در حال حاضر روش استاندارد و مناسبی برای سرولوژی وجود ندارد و بجز موارد خاص که با هماهنگی سطح ستادی صورت می گیرد از بیماران نمونه سرمی تهیه نمی گردد.	مواد بیولوژیک، گروه B	نیاز به فریز نمودن نیست.	نیاز نیست	نمونه سرم برای سرولوژی یا تعیین ویروس (در صورت امکان همیشه دو نمونه سرم تهیه شود؛ یکی در فاز حاد در هفته اول و یکی در فاز نقاهت که ترجیحاً ۳ تا ۴ هفته بعد می باشد)
برای تعیین ویروس مخصوصاً در هفته اول بکار می رود	مواد بیولوژیک، گروه B	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرمای یخچال).	ضد انعقاد EDTA	خون کامل

- در صورتیکه نمونه اول بیمار منفی گزارش گردید اما نمای بالینی بیمار مطرح کننده تشخیص کورونا ویروس MERS باشد، نمونه دوم (ترجیحاً خلط، آسپیره تراشه یا لاواژ ترشحات برونش) در عرض ۷ روز بعد از گرفتن نمونه اول به آزمایشگاه ارسال گردد. در صورتیکه بیماری شدید و سیر سریع داشته باشد می توان در فاصله کوتاهتر (بعد از ۳ روز از نمونه گیری اول) نیز نمونه گیری دوم را انجام داد.

#### نمونه های مورد نظر و اولویت های نمونه گیری:

بهترین نمونه ها که امکان مثبت شدن جواب در آنها بیشتر می باشد شستشوی مایع برونکوآلئونولار (BAL) و آسپیره ترشحات نای با ساکشن می باشد. خلط در رده بعدی ارزش قرار دارد. سواب دهانی حلقی یا بینی حلقی کمترین احتمال را برای مثبت شدن دارند اما در برخی مراحل بیماری می توانند به تشخیص کمک نمایند.

❖ در صورتی که بیمار هنوز مورد انتوباسیون (لوله گذاری نای) قرار نگرفته و در بخش ویژه

(ICU) بستری نشده است در صورت امکان از وی نمونه خلط تهیه گردد و در صورتی که

نمونه خلط امکان پذیر نمی باشد نمونه سواب حلقی به دقت تهیه و ارسال شود.

❖ اما در مورد بیمارانی که انتوباسیون شده اند و در ICU بستری شده اند در صورت امکان

نمونه ترشحات نای (ساکشن ترشحات نای) یا شستشوی ترشحات برونکو آلئونولار

(BAL) از روش برونکوسکوپی تهیه شود.

هرچند نمونه ترشحات تنفسی تحتانی و مدفوع برای جمع آوری از بیمار ارجح هستند اما در حال حاضر نمونه های

توصیه شده برای تهیه و ارسال به آزمایشگاه کشوری فرانس نمونه های ترشحات تنفسی (ترجیحاً خلط ، سواب

حلق و یا سایر ترشحات تنفسی تحتانی) می باشند.

پس از کشف یک مورد قطعی بیماری، بررسی تماس یافتگان انجام می شود و نمونه سرم تماس یافتگان علامتدار بر

اساس دستورالعمل جمع آوری گردیده و در آزمایشگاه استان یا شهرستان نگهداری یا ذخیره می گردد.

برای انتقال در مدت زمان کوتاه باید نمونه تهیه شده را در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری

و در سریعترین زمان (در عرض ۲۴ الی ۷۲ ساعت؛ ترجیحاً ۲۴ ساعت اول) منتقل نمود. اگر در ارسال نمونه ممکن است

تاخیری ایجاد گردد پس از تهیه نمونه، آنرا در اولین فرصت در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد نمائید (با

توجه به موارد استثناء که در ادامه بیان خواهند شد).



۱. بر روی هر نمونه تهیه شده از بیمار باید تاریخ تهیه نمونه، نوع نمونه تهیه شده و کد مشخصه بیمار(کد رهگیری دریافت شده از سامانه ثبت الکترونیک انفلوانزا "IIS") ذکر شوند.
۲. باید به همراه نمونه هایی که از نظر بررسی کورونا ویروس برای آزمایشگاه کشوری رفرانس تهیه می شوند، یک برگه ضمیمه (فرم لیست خطی) نیز ارسال شود که در آن علاوه بر نام بیمار، نام بیمارستان بستری کننده، کشوری که در ۱۴ روز اخیر سفر داشته است، وضعیت بستری بیمار نیز بدقت ثبت گردد.

#### جمع آوری نمونه از دستگاه تنفسی بیمار

##### ۱. نمونه گیری از دستگاه تنفسی تحتانی:

- مایع پلور، آسپیره ترشحات نای، شستشوی آلونول و کیسه های هوایی (Bronchoalveolar lavage)

در یک ظرف غیرقابل نشت، استریل، دارای درب پیچ شونده مخصوص جمع آوری خلط، ۲ الی ۳ سی سی از این مایعات را بریزید. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمایید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمایید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمایید.

##### • خلط

از بیمار بخواهید تا مقداری آب را در دهان غرغره نماید و سپس با یک سرفه قوی و عمیق ترشحات خلط عمقی خود را از گلو مستقیماً به درون ظرف استریل و غیرقابل نشت (دارای درب پیچدار) بریزد. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمایید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمایید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمایید.

##### ۱. نمونه گیری از دستگاه تنفس فوقانی:

- سوآب دهانی حلقی (Oropharyngeal) و بینی حلقی (Nasopharyngeal):

تنها از سواب های با الیاف مصنوعی و دسته پلاستیکی (سواب داکرون) استفاده شود. از سواب های دارای آلزینات کلسیم و سواب های دارای دسته چوبی استفاده نگردد چرا که دارای موادی هستند که ویروس ها را غیرفعال نموده و باعث مهار آزمایش PCR می شوند. سواب ها بلافاصله در لوله استریل دارای ۲ الی ۳ سی سی ماده انتقال ویروس (VTM- viral transport media) قرار داده شوند. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

- سواب بینی حلقی (نازوفارنژیال): سواب را بطور موازی با استخوان کام وارد بینی نموده و چند ثانیه در محل نگاه دارید تا ترشحات را جذب نماید. از هر دو حفره بینی باید نمونه تهیه شود (با یک سواب).
- سواب دهانی حلقی (اوروفارنژیال): بدون برخورد سواب با زبان و لوزه ها، از ته حلق نمونه تهیه گردد.

#### • ترشحات بینی:

در این روش ۲ الی ۳ سی سی از ترشحات بینی، در ظرف استریل و غیر قابل نشت دارای درب پیچدار مخصوص نمونه خلط، ریخته می شود. نمونه در سرمای یخچال نگهداری و منتقل گردد و اگر بیش از ۷۲ ساعت (ترجیحاً ۲۴ ساعت) در ارسال نمونه تاخیر وجود دارد باید نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد نمود.

#### • تهیه نمونه سرم خون:

برای آزمایش آنتی بادی های سرم لازم می شود نمونه سرم خون بیمار تهیه گردد. بهتر است نمونه سرم در مرحله حاد بیماری، ترجیحاً در هفته اول تهیه شود و نمونه بعدی با فاصله حداقل ۳ هفته و در مرحله نقاهت تهیه گردد.

**کودکان و بالغین** - حدود ۵ تا ۱۰ سی سی خون کامل را در لوله ریخته و اجازه می دهند تا لخته شود، سانتریفیوژ مختصر نموده و نمونه سرم را در لوله استریل جمع آوری کننده سرم می ریزند. حداقل نمونه سرم که برای آزمایش لازم می شود ۲۰۰ میکرولیتر است. نمونه سرم در سرمای یخچال نگهداری و منتقل می شود. منجمد نمودن و جایجایی نمونه منجمد نیز قابل انجام است.

**شیرخواران** - برای انجام آزمایش در شیرخواران حداقل یک سی سی نمونه خون کامل لازم است تهیه شود.

• **تهیه پلاسمای خون (خون EDTA):**

مقدار ۱۰ سی سی خون را در لوله آغشته به هپارین (درب سبز) یا لوله دارای EDTA (درب قرمز) بریزید. برای نگهداری و انتقال نمونه از سرمای یخچال استفاده می شود. **دقت نمائید نمونه نباید منجمد گردد.**

• **تهیه نمونه مدفوع:** (تا اطلاع ثانوی این نوع نمونه جهت تشخیص بیماری تهیه نمی گردد)

مقدار ۲ تا ۵ گرم مدفوع (آبکی یا غیرآبکی) را در ظرف استریل مخصوص جمع آوری خلط که درب پیچدار داشته و غیرقابل نشت باشد جمع آوری نمایید. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

**حمل و نقل نمونه:**

نمونه های بیماران مشکوک به عفونت کوروناویروس MERS باید بر اساس دستورالعمل های انجمن حمل و نقل هوایی بین المللی (IATA) بسته بندی و حمل و نقل گردند. اگر در ارسال نمونه ها تاخیر وجود دارد و باید نمونه را به مدت زیاد (بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت) برای مسافت های طولانی حمل و نقل نمود، می توان بطور **ترکیبی** از یخ خشک (جهت انجماد) و ice-pack ژلی استفاده نمود زیرا ice-pack های ژلی در صورت تمام شدن یخ خشک می توانند به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نمونه را در سرمای حرارت ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد حفظ نمایند

**روش آزمایشگاهی تایید وجود ویروس MERS**

روش تایید معمول کوروناویروس جدید (MERS-CoV) بر اساس تعیین سکانس ژنتیکی منحصربفرد ویروس توسط real-time RT-PCR است.

لازم به ذکر است در بیماران علامتدار تنها به صرف وجود مجموعه ای از چند جواب منفی آزمایشگاهی نمی توان تشخیص را رد نمود.

## دستور العمل نمونه گیری بوتولیسم

### نمونه های مورد نیاز:

نمونه ها باید قبل از درمان با آنتی توکسین گرفته شوند و در تهیه و ارسال آنها بر حسب نوع بوتولیسم باید شرایط زیر رعایت گردد:

• نمونه مدفوع و مواد غذایی:

به مقدار 25-50 gr و به همان مقدار باید از محتویات معده را اسپیره نمود و یا از مواد غذایی مشکوک نمونه جمع آوری هر سه نمونه (مدفوع، محتویات معده، غذا) و در درجه حرارت یخچال نگهداری و ارسال شود.

• نمونه سرم:

۱۰-۱۵ میلی لیتر از سرم بیمار باید تهیه و ارسال شود.  
• در موارد مشکوک به بوتولیسم زخم، علاوه بر تهیه نمونه سرم می بایستی نمونه سواب نیز از محل زخم تهیه و ارسال گردد.

### - ارسال نمونه ها:

برای اطلاع از شرایط و نحوه ارسال نمونه ها، به صفحه 22 رجوع شود.

### ۳۵- آزمایشگاه مرجع:

انستیتو پاستور ایران پس از دریافت نمونه ها و انجام بررسی آزمایشگاهی، نتیجه کشف توکسین و یا رشد ک. بوتولینوم را در فرم آزمایش بوتولیسم (Botulism test form) در سه نسخه ثبت می نماید. یک نسخه به مرکز مدیریت بیماریها، یک نسخه به مرکز بهداشت استان ارسال و نسخه دیگر به عنوان سابقه در آزمایشگاه نگهداری می شود.

### ۸- توصیه های لازم برای تهیه و ارسال نمونه ها:

- ۸-۱- نمونه و یا نمونه های مواد غذایی باید نماینده کل مواد غذایی مشکوک باشد.
- ۸-۲- تکمیل فرم ارسال نمونه
- ۸-۳- نمونه های تهیه شده در اسرع وقت باید به آزمایشگاه ارسال گردد.
- ۸-۴- ثبت مشخصات بیمار در روی نمونه

## دستورالعمل نمونه گیری بیماریهای منتقله از آب و غذا

### ضمیمه ۹

#### روش‌ها و تجهیزات برای جمع‌آوری نمونه

##### نمونه‌های بالینی

##### کلیات

نمونه‌ها را در قوطی ایمن قرار دهید. و آنها را با قلم ضد آب برچسب بزنید. این قوطی را در یک جعبه ضد آب همراه با الیاف، دستمال کاغذی یا سایر مواد خشک کننده جهت جذب و هر نشستی قرار دهید. تمام قوطی های نمونه را در یک جعبه عایق شده، که با یخ یا بسته های منجمد خنک کننده بسته بندی شده است، قرار دهید و آنها را در اولین فرصت ممکن به آزمایشگاه ارسال کنید. اگر نمونه‌های ارسالی به وسیله پست یا پیک فرستاده می شود، مطمئن شوید که در طی ساعات‌های کاری روزهای هفته فرستاده می‌شود. آدرس بسته‌ها واضح و شامل اسم و شماره تلفن آزمایشگاه دریافت کننده باشد. هشدارها را به صورت مناسب بنویسید، مثلاً نمونه‌های پزشکی. بعد از رسیدن به محل، گیرنده تلفن بزند. در یخچال نگه داشته شود.

##### مدفوع

نمونه‌های مدفوعی را در اولین فرصت ممکن جمع‌آوری نمایید، زیرا تاخیر ممکن است از تشخیص عامل ایجاد کننده جلوگیری کند. به صورت ایده‌آل، سواب مدفوع تازه یا سواب رکتال برای آزمایش باکتریولوژیک، مقدار زیاد مدفوع اسهالی (حداقل ۳۰ گرم) برای آزمایش ویروسی و مدفوع حجیم تازه (با ماده نگهدارنده) برای آزمایش انگل شناسی باید جمع‌آوری شود.

### باکتریایی

حداقل دو سواب رکتال یا سواب مدفوع تازه (کمتر از یک ساعت پیش) از هر بیمار گرفته شود:

- در صورت امکان پیشاپیش محیط انتقال Cary-Blair را خنک نگه‌دارید، به طوری که سواب در محیط خنک قرار گیرد.
- سواب را در محیط Cary-Blair برای مرطوب ماندن قرار دهید.
- سواب را ۳-۵ سانتی متر در رکتوم قرار دهید و به آرامی بچرخانید.
- سواب را بردارید و امتحان کنید تا مطمئن شوید که نوک پنبه‌ای آن با مدفوع آغشته می‌شود.
- سواب را بلافاصله در لوله محیط انتقال قرار دهید.
- سواب را به ته لوله هل دهید.
- این روش را با سواب دوم تکرار کنید و در همان لوله اول قرار دهید.
- بخش بالایی چوب سواب را بشکنید، به طور محکم سر پیچی آن را سفت نمایید.

اگر نمونه‌ها در طی ۴۸ ساعت بعد از جمع‌آوری به آزمایشگاه می‌رسد، می‌توانید آنها را در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  در یخچال نگهداری نمایید. می‌توان از نمونه‌های نگهداری شده در یخچال تا ۷ روز پس از جمع‌آوری پاتوژن‌ها را بدست آورد. نگهداری خنک حداکثر به مدت ۳۶ ساعت در جعبه‌ای که به طور مناسب عایق بندی شده، با بسته‌های منجمد خنک‌کننده یا یخ خیس، می‌تواند در طی حمل و نقل انجام شود. اگر رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه در طی ۲ روز ممکن نیست، می‌توان آنها را در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - (فریزر خانگی) منجمد کرد، اگرچه منجمد نمودن در  $70^{\circ}\text{C}$ - (فریزر فوق پایین) ارجح است. نمونه‌های منجمد باید با یخ خشک حمل شود. هشدارهای زیر را در نظر بگیرید:

- نمونه‌ها را از تماس مستقیم با یخ خشک محافظت کنید، زیرا سرمای شدید می‌تواند لوله‌های شیشه‌ای را ترک دهد.

- نمونه‌ها را از طریق مهر و موم کردن درب پیچی لوله با نوار یا با گذاشتن لوله‌ها در جعبه<sup>۱</sup> پلاستیکی در برابر دی‌اکسید کربن محافظت نمایید.
- مطمئن شوید که قوطی حداقل در  $\frac{1}{4}$  پر از یخ خشک است.

#### ویروس‌ها

مقدار زیاد (در صورت امکان به مقدار زیاد اما حداقل ۱۰ میلی لیتر) از مدفوع اسهالی که با ادرار مخلوط نشده است را در قوطی خشک، تمیز، ضد نشت قرار دهید. جهت تشخیص عامل ویروس خاص، نمونه‌ها باید در طی ۴۸ ساعت اول بیماری جمع‌آوری شود. نمونه‌ها به سرعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  در یخچال قرار گیرد (منجمد نشود)، و در صورت امکان در اولین فرصت به آزمایشگاه فرستاده شود.

#### انگل‌ها

مدفوع حجیم تازه که با ادرار مخلوط نشده است را بگیرید و در یک قوطی تمیز بگذارید. سپس محلول نگهدارنده (۱۰٪ فرمالین یا ۱۰٪ الکل پلی وینیل) به نسبت یک بخش مدفوع با سه بخش نگهدارنده اضافه کنید. اگر تاخیر در اضافه نمودن مواد نگهدارنده وجود دارد، نمونه‌های مدفوعی دست نخورده را در  $4^{\circ}\text{C}$  (منجمد نشود) به مدت حداکثر ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری کنید. وقتی مواد نگهدارنده اضافه شد، می‌توان نمونه‌ها را بسته بندی نمود و در دمای اتاق منتقل کرد و یا مجدداً در یخچال گذاشت.

#### استفراغ

اگر بیمار در زمان بررسی همچنان استفراغ دارد، استفراغ را جمع‌آوری نمایید، اجازه دهید بیمار به طور مستقیم در قوطی نمونه‌گیری که دقیقاً تمیز شده و در آب جوشیده شده است، استفراغ کند. نمونه را مستقیماً در آزمایشگاه بگیرید. اگر این موضوع امکان‌پذیر نیست نمونه را در یخچال نگهداری نمایید (اما منجمد نشود).

**سرم**

در بررسی طغیان‌های بیماری منتقله از غذا، گاهی اوقات آزمایش سرولوژیک برای تعیین ایجاد آنتی بادی در اثر عفونت سودمند است.

خون باید تنها به وسیله شخصی که به طور اصولی جهت انجام روش خون‌گیری تعیین شده است، گرفته شود، تا اصول نمونه‌گیری را رعایت نماید. در صورت امکان، نمونه‌های خون از همان بیماری که نمونه‌های مدفوعی گرفته شده بود، گرفته شود.

دو نمونه سرم- یکی مرحله حاد و یکی مرحله نقاهت- برای هر بیمار جهت علت ایجاد بیماری با ویروس یا باکتری، بفرستید. در صورت امکان نمونه سرمی مرحله حاد به فاصله کوتاهی از شروع بیماری گرفته شود (حداکثر در طی یک هفته بعد از شروع بیماری). نمونه سرم مرحله نقاهت باید ۳ هفته- یا اگر به عامل ویروسی مشکوک هستیم، ۶ هفته- بعد از شروع بیماری گرفته شود. نمونه‌های خون از بالغین (CC ۱۵) و از بچه‌ها (CC ۳) در لوله‌ای که حاوی عوامل ضد انعقادی نیست، جمع‌آوری گردد. برای مطالعه آنتی بادی نمونه‌ها نیازی به نگهداری در یخچال در طی روز جمع‌آوری ندارد (مگر اینکه هوا به شدت گرم باشد)، اما باید دور از نور مستقیم خورشید قرار گیرد. خون را سانتریفیوژ نمایید و تنها سرم را برای آنالیز بفرستید. اگر سانتریفیوژ در اختیار ندارید، نمونه‌های خون را در یک یخچال تا زمانی که لخته تشکیل شود نگهداری نمایید. سپس سرم را جدا کرده و آن را در یک لوله استریل خالی پیپت کنید. لوله‌های سرمی چرخیده یا نچرخیده را در یخچال نگهداری نمایید و به صورت خنک حمل نمایید.

**ادرار**

محل اطراف سوراخ ادراری را با یک پنبه که از قبل با تنتورید ۴٪ یا سایر عوامل ضد عفونی‌کننده مناسب آغشته شده است، تمیز نمایید. در توالی شروع به ادرار

نمودن نمایید و CC ۳۰ نمونه و سطر ادرار را جمع‌آوری نمایید. نمونه باید در یخچال نگهداری شود اما یخ نزند.



## دستورالعمل نمونه برداری از نمونه مشکوک به سیاه زخم

### مونه برداری:

- 1- از زخم: از عمق زخم نمونه برداری کرده به محیط تایو یا نرمال سالین یا BHI انتقال میدهیم.
- 2- از خون: به محیط کشت خون انتقال میدهیم.
- 3- از گلو: سواب گلو را به محیط های انتقالی, انتقال میدهیم. محیط های انتقالی: ((VTM))

خانم دکتر شاهچراغی: انستیتو پاستور

66405535

## نمونه گيري جهت تشخيص آزمایشگاهی سرخک و سرخجه و آريون

این راهنما به منظور ارایه اطلاعات علمی و فنی لازم بر اساس اصول و استانداردهای بین المللی در کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است.

### اعضا کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی به ترتیب حروف الفبا عبارتند از:

دکتر امینی عضو هیئت علمی انیستیتوی پلستور - بخش هیاتیت و آیدز  
دکتر حاجی اعمو هیئت علمی آزمایشگاه مرجع سلامت  
دکتر سمیعی عضو هیئت علمی معاونت دارو و غذا و آزمایشگاه مرجع سلامت  
دکتر شاهرخی عضو هیئت علمی انیستیتوی پلستور - بخش بیولوژی ملکولی  
دکتر صباحی عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده پزشکی  
دکتر مختاری آزاد عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکده بهداشت  
دکتر ناجی عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - مرکز پزشکی مسیح دانشوری

ویراستار: آقای امیر سهرابی کارشناس ارشد ویروس شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت

بازبینی

دکتر مختاری آزاد

عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکده بهداشت

## نمونه‌گیری جهت تشخیص آزمایشگاهی سرخک و سرخچه و اوریون

### سرخچه

سرخچه (*Rubella*) یک بیماری ویروسی است. گاهی اوقات ضایعات پوستی آن شبیه سرخک یا مخملک تظاهر پیدا می‌کند. این بیماری در کودکان، نشانه‌های عمومی ندارد یا اینکه نشانه‌های بسیار جزئی دارد اما نزد بزرگسالان می‌تواند به صورت تب خفیف ۱ تا ۵ روزه، سردرد، بیقراری، ترشح خفیف بینی و التهاب ملتحمه بروز کند. از نشانه‌های بالینی مشخص سرخچه التهاب غده‌های لنفاوی پشت چشم، زیر استخوان پس سری یا پشت گردنی می‌باشد که حدود ۵ تا ۱۰ روز قبل از ظاهر شدن ضایعات پوستی ایجاد می‌شود. در ۵۰ درصد موارد ممکن است بیماری بدون ضایعات پوستی باشد.

### سرخک

سرخک یک بیماری عفونی و مسری در اثر یک ویروس RNA از خانواده پارامیکسوویریده ایجاد می‌شود. توسط ترشحات تنفسی گسترش پیدا می‌کند. بیماری با یک علامت اولیه مشخص می‌شود که به مدت ۳ تا ۵ روز دوام دارد و شامل سرفه، آبریزش بیش از حد از بینی، التهاب ملتحمه، بی‌حالی، بی‌اشتهایی و تب بالا رونده تا  $39/5^{\circ}\text{C}$  می‌گردد. خال‌های کاپلیک (Koplik's Spots) را می‌توان در غشاء مخاطی دهان یا لبها طی دوره علامت اولیه تشخیص داد که مشخصه سرخک می‌باشند. بیماری سرخک شدیداً مسری است و سرایت آن اغلب بطور مستقیم یعنی از راه تماس صورت می‌گیرد.

### اوریون

ویروس اوریون از راه تنفس انتشار یافته و به گونه پارامیکسو ویروس تعلق دارد. شایع‌ترین نمایی بالینی اوریون تورم غدد بزاقی به ویژه غدد بناگوشی است. بیماران معمولاً تبی با درجه کم، سندرم خستگی مزمن (Fatigue Syndrome) و درد غدد بناگوشی دارند که بعد از ۲ تا ۳ روز چنان بزرگ می‌شود که زاویه فک تحتانی را مسدود می‌نماید. تورم معمولاً دو طرفه است و تا مدت ۷ تا ۱۰ روز باقی می‌ماند. انسان‌ها تنها مخزن شناخته شده آن می‌باشند و فقط یک نوع آنتی ژنی از ویروس وجود دارد. واکسن ویروس زنده و تضعیف شده آن بسیار مؤثر است و در ترکیب با واکسن‌های سرخک و سرخچه تزریق می‌گردد.

### تهیه نمونه

۱- نمونه گلو: جهت انجام بررسی ویرولوژی تهیه نمونه گلو لازم می‌باشد.  
 زمان نمونه‌گیری: یک هفته قبل از بروز علائم تا دو هفته بعد از بروز علائم می‌توان نمونه‌گیری کرد ولی بهترین زمان ۵ روز اول بعد از بروز بثورات جلدي در سرخک و سرخچه و یا بروز علائم در بیماری اوریون است.

**روش کار:****الف) روش غرغره کردن:**

- ۱- دو میلی لیتر محیط مخصوص انتقال (نمونه ویروس)، غرغره شود. این نمونه باید با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها و حداکثر طی ۴۸ ساعت در شرایط سرد به آزمایشگاه ملی سرخک ارسال گردد. البته به نظر می رسد بدلیل ایجاد آلودگی های که ممکن است در این روش پیش آید، بهتر است حداقل امکان از روش های اشاره شده در ذیل استفاده گردد.
- ۲- در مواردی که امکان ارسال در مدت زمان فوق امکان پذیر نباشد نمونه در فریزر C ۷۰- یا پائین تر نگهداری شود.

**ب) روش سواب:**

- ۱- در موارد که امکان غرغره کردن نباشد (مانند کودکان)، از سواب استریل از جنس الیاف مصنوعی مانند داکرون (Dakron) و یا ریون (Rayon) برای نمونه گیری استفاده شود.
  - ۲- سواب را چندین بار بر روی انتهای حلق (نازوفارنکس) بکشید بطوریکه سلولهای اپیتلیال کنده شده به آن بچسبند.
  - ۳- سواب را در لوله در پیچ دار حاوی دو میلی لیتر محیط مخصوص انتقال، قرار داده و خوب تکان دهید و سر سواب را بشکنید تا بتوانید در لوله در پیچ دار را ببندید.
- با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها، نمونه را در دمای مناسب (۴-۸ درجه سانتیگراد) و در اسرع وقت (طی ۴۸ ساعت)، به آزمایشگاه ملی سرخک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ارسال نمایند.
- در مواردی که امکان ارسال در مدت زمان فوق امکان پذیر نباشد نمونه در فریزر C ۷۰- یا پائین تر نگهداری شود.

**۲- نمونه ادرار:****روش کار:**

- ۱- ۲۰ تا ۵۰ سی سی ادرار (ترجیحاً ادرار اول صبح) در ظرف استریل گرفته شود و بلافاصله با رعایت زنجیره سرما (۴-۸ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه ارسال گردد.
  - ۲- در آزمایشگاه لوله حاوی نمونه را در سانتریفوژ یخچال دار (۴-۸ درجه سانتیگراد) با دور rpm ۱۵۰۰ یا ۵۰۰g به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ نمایید.
  - ۳- مایع رویی را دور بریزید.
  - ۴- رسوب حاصل را در یک میلی لیتر محیط ترانسپورت به صورت تعلیق در آورید.
  - ۵- محلول فوق را در لوله های در پیچ دار ریخته و در آن را محکم ببندید.
  - ۶- با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها، طی مدت ۴۸ ساعت در شرایط سرد به آزمایشگاه ملی سرخک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ارسال نمایید.
- تذکر ۱:** نمونه ادرار نباید قبل از عمل تغلیظ ادرار (سانتریفوژ کردن)، منجمد شود.

- تذکر ۲:** نمونه ادرار باید طی مدت ۱۰ روز اول بعد از شروع راش، جمع آوری شود.
- تذکر ۳:** نمونه ادرار باید در ظرف استریل، جمع آوری شود.
- تذکر ۴:** نمونه ادرار باید تا زمان سانتریفوژ در درجه حرارت ۴-۸ درجه سانتیگراد قرار گیرد.
- تذکر ۵:** ارجحیت عمل سانتریفوژ در ۲۴ ساعت اول جمع آوری نمونه است.
- تذکر ۶:** رسوب ته نشین شده باید به لوله حاوی یک میلی لیتر محیط ترانسپورت منتقل شود و در درجه حرارت ۴-۸ درجه سانتیگراد و حداکثر طی مدت ۴۸ ساعت به آزمایشگاه رفرانس منتقل شود. در غیر این صورت نمونه را در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود

### ۳- نمونه خون کامل برای آزمایشات سرولوژیک و جداسازی ویروس از سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC):

- ۱- توسط سرنگ استریل حداقل ۵ میلی لیتر از خون، در لوله برچسب دار استریل و حاوی EDTA جمع آوری شود.
- ۲- نمونه خون می تواند در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه فرستاده شود و حداکثر به مدت ۴۸ ساعت بعد از جمع آوری نمونه PBMC ها باید از خون کامل جدا گردند.
- ۳- نمونه خون کامل، نباید منجمد شود.
- ۴- به نسبت ۱:۱ خون و PBS مخلوط شود و سپس مخلوط فوق در یک لوله آزمایش مجزا و به آرامی بر روی ۲ میلی لیتر محیط جداسازی لنفوسیت اضافه شود.
- ۵- لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شود.
- ۶- برای از حرکت باز ایستادن روتور از ترمز سانتریفوژ استفاده نشود.
- ۷- به آرامی و با دقت توسط پی پت پاستور حلقه سفید تشکیل شده که در بالای رسوب گلبول های قرمز و حاوی PBMC می باشد جمع آوری شود و در یک لوله آزمایش جدید ریخته شود .
- ۸- به میزان ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر PBS به این لوله جدید اضافه شود .
- ۹- پس از سانتریفوژ رسوب ایجاد شده را با استفاده از محیط کشت سلول فاقد سرم مانند (DMEM) سوسپانسیون تهیه شود .
- ۱۰- سوسپانسیون بدست آمده به ۲ لوله مجزا تقسیم شود و در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد قرار داده شود .

### شرایط نگهداری و ارسال نمونه ها برای انجام آزمون RT-PCR :

- ۱- نمونه ها را حداکثر تا ۴۸ ساعت با رعایت زنجیره سرد (۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه رفرانس ارسال نمایید .
- ۲- هرگز نمونه ها را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار ندهید و از ذوب و منجمد نمودن آن پرهیز کنید.

- ۳- در صورت عدم امکان ارسال ظرف ۴۸ ساعت نمونه ها را در دمای ۷۰- درجه قرار دهید و جهت ارسال نمونه ها از یخ خشک و لوله های دربیچ دار استفاده نمایید .
- ۴- در صورت عدم وجود فریزر ۷۰- درجه نمونه ها را در ۴ درجه نگهداری کنید و در اسرع وقت با رعایت زنجیره سرد (۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه رفرانس ارسال نمایید.

#### توجه:

- در موارد سندرم سرخجه مادر زادی (CRS) نیز نمونه های ترشحات نازوفارنژیال ، ادرار ، CSF و PBMC می توان استفاده نمود .
- در موارد مننژیت ناشی از اریون در ۱۰ روز اول شروع بیماری نمونه مایع نخاع در شرایط استریل تهیه و در شرایط سرد به آزمایشگاه ارسال شود و یا در فریزر ۷۰- تا زمان ارسال نگهداری شود.
  - محیط مخصوص انتقال نمونه با هماهنگی آزمایشگاه ملی سرخک در اختیار قرار خواهد گرفت.
  - با هر نمونه، یک فرم ارسال نمونه تکمیل می گردد.

#### تشخیص آزمایشگاهی:

- تشخیص آزمایشگاهی عوامل مذکور به طرق ذیل صورت می پذیرد.
- ۱- تشخیص سریع رنگ آمیزی فلورسنت آنتی بادی
  - ۲- آزمایشات سرولوژیک
  - ۳- کشت ویروس
  - ۴- آزمایشات ملکولی

## دستورالعمل نمونه برداری از نمونه مشکوک به مننژیت

۱۴ روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص مننژیت

۲. نام پدر
۳. سن و جنس
۴. نام بیمارستان
۵. شماره اتاق / شماره تخت
۶. نام و نشانی پزشک
۷. محل آناتومیک جمع‌آوری نمونه (نخاع کمری، شانت و ...)
۸. تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه
۹. تشخیص بالینی و تاریخچه بیماری
۱۰. مصرف آنتی‌بیوتیک و نوع آن در ۴۸ ساعت اخیر
۱۱. نوع نمونه (CSF / خون)
۱۲. آزمایش مورد درخواست (کشت، شمارش سلولی، بیوشیمی (قند - پروتئین - LDH) و سروولوژی [آگلوتیناسیون لانتکس<sup>۱</sup> - CRP]).

### ۲-۱. اطلاعات مورد نیاز ثبت‌شده روی برچسب هر نمونه

نام بیمار:	
شماره اتاق:	شماره تخت:
نوع نمونه:	
تاریخ و ساعت جمع‌آوری نمونه:	
آزمایش مورد درخواست:	

### ۳-۱. اطلاعات لازم جهت پذیرش نمونه (CSF / خون) در آزمایشگاه

- کد پذیرش
- نام بیمار
- نوع نمونه دریافتی
- تاریخ و ساعت نمونه دریافتی

1. Lactate-Dehydrogenase  
2. Latex agglutination  
3. C-Reactive Protein

## تعریف

### مایع مغزی نخاعی

CSF اولین بار توسط Cotango در سال ۱۷۶۴ شناخته شد. عملکرد این مایع که در اطراف مغز و نخاع جریان دارد، تأمین مواد غذایی، دفع مواد زائد و حفاظت از سیستم اعصاب مرکزی است. مایع مغزی نخاعی از شبکه کورونید تولید شده و مقدار تام آن در نوزادان ۶۰-۱۰۰ و در بالغین ۱۷۰-۱۴۰ ml است.

نمونه CSF یک نمونه اورژانس بوده و باید هرچه سریع‌تر آزمایش و نتایج آن گزارش شود.

جهت انجام آزمایش مایع مغزی نخاعی و خون مراحل زیر مورد توجه قرار می‌گیرد:

۱. ثبت اطلاعات
۲. نمونه‌گیری
۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی نخاعی

## ۱. ثبت اطلاعات

### ۱-۱. فرم درخواست انجام آزمایش‌های CSF / خون

توصیه می‌شود اطلاعات مربوط به تمام نمونه‌های بالینی در فرمی حسابی موارد زیر ثبت شود:

۱. نام بیمار

1. Cerebrospinal Fluid

## ۲. نمونه‌گیری

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی در جداسازی و تعیین هویت عوامل میکروبی مولد مننژیت بسیار حائز اهمیت است. توصیه می‌شود تا حد امکان قبل از درمان آنتی‌بیوتیکی از بیمار نمونه‌گیری شده تا از نابودی میکروارگانیزم جلوگیری شود. البته باید توجه داشت هرگز به منظور جمع‌آوری نمونه درمان بیمار به تأخیر نینهد. مایع مغزی نخاعی و خون باید هرچه سریع‌تر به آزمایشگاه منتقل شده و تحت آزمایش قرار گیرد.

### روش جمع‌آوری CSF

جمع‌آوری نمونه CSF روشی تهاجمی است و باید به دست افراد کارآزموده و در شرایط آسپتیک انجام شود. در صورت احتمال وجود مننژیت در بیمار، CSF بهترین نمونه بالینی برای جداسازی و تعیین هویت عامل بیماری‌زا است. جمع‌آوری CSF توسط پزشک به روش LP<sup>۱</sup> و کاملاً آسپتیک (عاری از هرگونه آلودگی میکروبی) و فقط برای تشخیص انجام می‌شود.

لازم است نمونه‌ها هرکدام به حجم تقریبی ۱-۳ ml در سه لوله استریل در پیچ‌دار شامل لوله شماره ۱ (مخصوص آزمایش‌های بیوشیمیایی)، لوله شماره ۲ (مخصوص آزمایش‌های میکروپزشناسی)، لوله شماره ۳ (جهت بررسی سلولی) جمع‌آوری شود و برای انجام آزمایش‌های مربوط به آزمایشگاه ارسال شوند.

در صورتی که CSF ارسالی به مقدار کمتر از ۱ ml و فقط در یک لوله باشد، جهت جلوگیری از آلودگی نمونه، ابتدا با سرمپلر استریل مقداری از آن برای بررسی سلولی به بخش خون‌شناسی فرستاده می‌شود. سپس بقیه آن سانتریفوژ شده، مایع رویی جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی

1. Lumbar Puncture

به بخش بیوشیمی ارسال گردیده و از رسوب باقیمانده آزمایش میکروپزشناسی به عمل می‌آید.

☞ لازم به ذکر است که حداکثر زمان گردش کاری پادشده، نباید بیش از یک ساعت (در حرارت اتاق) باشد.

### نکات ضروری

۱. انجام آزمایش CSF در هر زمان به‌عنوان یک آزمایش اورژانس تلقی می‌شود.
۲. از قراردادن نمونه در یخچال، حرارت زیاد و نور شدید اجتناب شود.
۳. از به‌کار بردن پنبه، جهت بستن سر لوله‌ها اکیداً خودداری شود.
۴. برای انتقال لوله‌ها از جالوله‌ای مناسب استفاده شود.
۵. در صورتی که امکان آزمایش فوری نمونه در آزمایشگاه میکروپزشناسی وجود نداشته‌باشد، از محیط ترانس‌ایزولیت (T-I)<sup>۱</sup> استفاده شود.
۶. لازم است نمونه توسط پزشک یا پرستار به آزمایشگاه منتقل شود.

## ۳. مراحل انجام آزمایش روی مایع مغزی نخاعی

### ۳-۱- بررسی فیزیکی (ظاهر - حجم)

- حجم: حجم CSF برحسب میلی‌لیتر گزارش می‌شود.
- ظاهر: ظاهر طبیعی CSF زلال و شفاف (Clear-Crystal) است. ظاهر CSF را پس از بررسی به یکی از موارد صفحه بعد (جدول‌های شماره ۱ و ۲) توصیف کنید.

1. Trans-Isolate  
2. Appearance





**انستیتو پاستور ایران  
بخش میکروب شناسی  
آزمایشگاه کشوری دیفتری**

دستور العمل نمونه گیری و  
ارسال نمونه

## دیفتری

- 1- آماده سازی مقدمات کار
- 2- روش نمونه گیری
- 3- طریقه انتقال نمونه ها در محیط ترانسپورت
- 4- تهیه لام مستقیم از نمونه ها
- 5- ارسال نمونه ها

## مقدمه :

دیفتری يك عفونت حاد است که توسط کرینه باکتریوم دیفتریه ایجاد می شود. ضایعه اولیه اغلب در حلق یا نازوفارنکس ایجاد می شود و با حضور يك غشاء کاذب خاکستری تا شیری رنگ (و گاهی سیاه) و انتشار آن در سطح لوزه ها و حلق مشخص می گردد. در هنگام رشد ارگانیزم و تکثیر آن در محل ضایعه، يك توکسین قوي تولید می شود که از طریق خون پخش شده و به بافتهاي دیگر می رود و ایجاد ضایعات هموراژیک و نکروتیک در ارگانهاي مختلف می نماید. هر دو فرم سم زا و بدون سم از کورینه باکتریوم دیفتریه ایجاد بیماری می کنند ولی گونه های تولید کننده توکسین علائم سیستمیک نیز ایجاد کرد و بیماری شدید و کشنده می دهند. انتقال از طریق سیستم تنفسي و توسط قطرات تنفسي فرد آلوده صورت می گیرد. بعد از تماس با عامل عفوني، دوره انکوباسیون بیماری 1-7 روز است و پس از استقرار باکتری در حلق و تولید توکسین و جذب آن به ارگانهاي مختلف قلب، سیستم عصبی و کلیه ها درگیر خواهند شد. بهمین دلیل تشخیص بموقع دیفتری و درمان با آنتی توکسین به همراه آنتی بیوتیکهاي مناسب بهترین راه کمک به بیمار است. بعلاوه گزارش به موقع از موارد مثبت دیفتری به اداره مبارزه با بیماریها به منظور بکارگیری روشهاي پیشگیری مناسب و درمان پروفیلاکسی در مناطق آلوده بسیار مفید و مؤثر است.

## I) آماده سازی مقدمات کار:

- 1- آماده نمودن بیمار و صحبت با او در مورد همکاری در زمینه نمونه گیری مناسب تا نتیجه بهتری بدست آید.
- 2- کامل کردن پرسش نامه مربوط به هر بیمار
- 3- دستکش و ماسک و برچسب کوچک جهت نمونه گیری
- 4- سواب استریل جهت نمونه گیری مورد استفاده قرار گیرد.
- 5- استفاده از آبسلانگ چوبی استریل برای پایین نگه داشتن زبان در حین نمونه گیری الزامی است.

6- از محیط Amies بعنوان ترانسپورت استفاده می شود و چنانچه این محیط قبل از استفاده بصورت در بسته بماند تا مدت 2 ماه قابل نگهداری در یخچال است.

7- لام میکروسکپ تمیز و نو جهت تهیه اسمیر و جعبه کوچک مخصوص لام جهت ارسال آن

## روش نمونه گیری :

وسایل لازم :

- 1- سواب استریل 6 عدد
- 2- آبسلانگ استریل 1-2 عدد
- 3- دستکش و ماسک
- 4- 3 عدد محیط ترانسپورت دیفتری (Amies)
- 5- لام 6 عدد

موضع نمونه برداری :

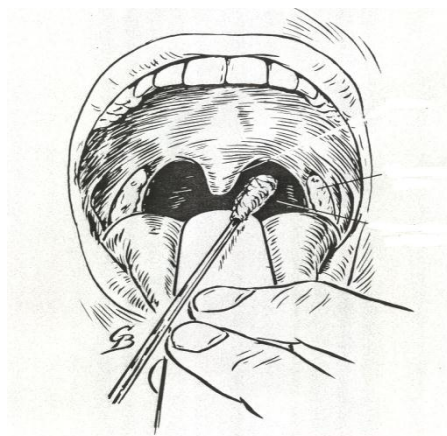
- 1- لوزه های حلقی و اطراف آنها
- 2- انتهای بینی

## II. طریقه نمونه برداری :

الف- نمونه گیری از حلق :

یک نمونه از آگزودای جراحات و در صورت وجود غشاء سفید رنگ یک نمونه هم از آن غشاء باید گرفته شود.

1. ابتدا با آبسلانگ استریل زبان بیمار را کاملاً به پایین فشار داده و از او خواسته می شود که حداکثر همکاری را بنماید.
2. دو سواب را بصورت چسبیده و در کنار هم در دست گرفته و محکم به سطح ضایعات کشیده می شود. برای هر موضع نمونه گیری لازم است دو سواب گرفته شود. یعنی برای جراحات 2 سواب ، در صورت وجود غشاء سفید یا کرم رنگ 2 سواب و 2 سواب هم برای تهیه نمونه از بینی ( جمعاً 6 سواب) که یکی از سواب ها برای کشیدن روی 2 عدد لام و دیگری برای بردن به داخل محیط ترانسپورت. ابتدا لازم است از غشاء سفید رنگ نمونه گیری شده و بطوریکه مقداری از آن کنده شود و سپس با کنار زدن این غشاء از جراحات زیر آن با شدت بوسیله سواب نمونه گیری شود.



طریقه نمونه گیری از حلق : از بیمار خواسته می شود تا دهان خود را باز کند و با ادای صدای (ah) جهت نمونه گیری همکاری کند. زبان به آرامی با آبنلانگ به پایین رانده می شود ، سپس سواب را به قسمت عقب فارنکس برده و در ناحیه لوزه ها چند بار به عقب و جلو کشیده می شود.

#### ب- نمونه برداری از انتهای بینی:

1. انتهای بینی جزء مناطقی است که احتمال جداسازی باسیل دیفتتری در آنجا بیشتر است. لذا با استفاده از یک سواب استریل به هر دو سوراخ بینی وارد می شویم و به اندازه 2-3 سانتی متر به آرامی به داخل فرو می کنیم و چند لحظه نگه می داریم تا ترشحات به آن جذب شوند.

2. یک سواب از هر دو سوراخ بینی و یک سواب هم برای تهیه 1 عدد لام مستقیم باید گرفته شود ( جمعاً 2 عدد سواب از هر سوراخ بینی و 2 عدد لام از هر سوراخ بینی).

### III. طریقه انتقال نمونه ها در محیط ترانسپورت :

1- سواب اول از حلق یا هر موضعی ( ترشحات حلق، غشاء کاذب و جراحات زیر آن) بر روی محیط ترانسپورت Amies فرو برده می شود و اضافه سواب

را شکسته و درب لوله را محکم می بندیم. سواب دوم را روی 2 لام جهت رنگ آمیزی گرم و آلبرت می کشیم.

3- سواب بینی هر دو طرف در يك لوله Amies فرو برده می شوند. محیطهای ترانسپورت بعد از نمونه گیری باید در یخچال قرار گیرد و در حداکثر ظرف مدت 48 ساعت ارسال گردد. اگر امکان ارسال آن بصورت فوری وجود دارد قبل از 24 ساعت به آزمایشگاه کشوری دیفتري ارسال گردد.

#### IV. تهیه لام مستقیم از نمونه ها :

1. لامهاي نو و تمیز باید استفاده شوند.
2. سواب حاوي نمونه را به آرامي در وسط لام بشكل بيضي کوچک با حرکت دوراني می کشیم تا نمونه روی لام منتقل شود. (لام باید غلیظ گرفته شود).
3. با چسباندن بر چسب بر روی هر لام مشخصات بیمار و محل نمونه گیری را یادداشت می شود.
4. پس از خشك شدن لام در هوای آزاد، هر 6 لام تهیه شده بوسیله حرارت (گذراندن سه بار از روی شعله چراغ آزمایشگاه) فیکس می شوند تا برای رنگ آمیزی آماده شوند.

#### V. ارسال نمونه ها :

1. چنانچه نمونه در تهران گرفته شده و امکان ارسال آن به آزمایشگاه ملي دیفتري و سیاه سرفه در انستیتوپاستور در همان روز نمونه گیری وجود دارد بهتر است در اسرع وقت 3 عدد محیط ترانسپورت Amies و 6 عدد لام مستقیم به این مرکز فرستاده شوند.
2. چنانچه نمونه در شهرستانها گرفته شده است و امکان ارسال آن در همان روز نباشد محیطهاي ترانسپورت حاوي نمونه را باید در  $4^{\circ}\text{C}$  (یخچال) قرار داد و در اسرع وقت (ظرف مدت 48 ساعت) به آدرس ذیل ارسال نمود

**نکته:** ارسال نمونه ها باید طبق دستورالعمل آزمایشگاه مرجع سلامت و بر اساس بسته بندی سه لایه صورت گیرد.

آدرس: تهران - انستیتوپاستور ایران، بخش میکروشناسی، آزمایشگاه  
کشوری دیفتري تلفکس: 66405535

آموزش آزمایشگاه



## دستور العمل شماره LA-WI-401 نحوه نمونه گیری صحیح باکتری بوردتلا پرتوسیسی (*Bordetella pertussis*) از بیماران مشکوک به سیاه سرفه

### مقدمه :

سیاه سرفه يك عفونت حاد باکتریایی در سیستم تنفسی است. حاد بودن بیماری همیشه باعث شده است که کوشش زیادی در راه تشخیص بموقع آن صورت گیرد. پس از استنشاق قطرات آلوده از طریق سرفه فرد بیمار توسط فرد سالم، ارگانیزم در راههای تنفسی کلونیزه شده و به مژکهای تنفسی می چسبد. علائم اولیه رینیت، سرفه، عطسه و گاهی کونژنکتیویت (ورم ملتهمه) است. تکثیر باکتری منجر به تولید توکسین می شود که این توکسین در نهایت منجر به نکروز می گردد. میزان مرگ و میر بیماری ناشی از درگیری سیستم عصبی است. لذا تشخیص بموقع و درمان مناسب بیمار بخصوص در نوزادان از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

از آنجاییکه نمونه گیری اولین و مهمترین گام در تشخیص درست و به موقع باکتری بوردتلا پرتوسیسی می باشد باید از سوی پزشکان و مسئولین محترم جدی گرفته شود.

### آماده سازی مقدمات کار:

- ابتدا باید وسایل مورد نیاز شامل 2 عدد سواب داکرون استریل- 2 عدد محیط ترانسپورت دارای تاریخ مصرف (2 ماه پس از تولید) - دستکش و ماسک و برچسب کوچک توسط مسئول نمونه گیری آماده شود. (محیط های ترانسپورت باید در یخچال نگهداری شوند و هنگام استفاده باید دارای تاریخ مصرف باشند)
- فرد مسئول نمونه گیری می بایست بیماران را آماده کرده و نحوه نمونه گیری را به آنها توضیح داده و به کمک بیمار فرم اطلاعات مربوط به بیمار را به طور کامل و دقیق پر کند.

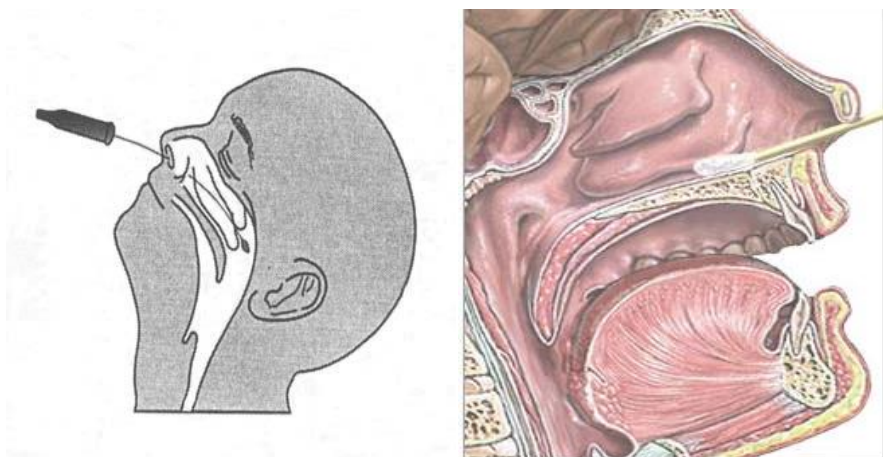
## روش نمونه گیری صحیح:

- **موضع نمونه گیری:** عامل سیاه سرفه (*Bordetella pertussis*) بشدت نسبت به خشکی حساس است. لذا باید مراقبت های لازم جهت جمع آوری نمونه و ارسال آن به آزمایشگاه انجام شود. بهترین نمونه آزمایشگاهی در صورت امکان آسپیره نازوفارنکس است که بایستی توسط پزشک مربوط گرفته شود، در غیر این صورت موكوس نازوفارنكس باید توسط سوابهای داكرون مخصوص جمع آوری شوند. نمونه جمع آوری شده از بینی و حلق امکان جدا سازی باکتری را کاهش می دهد.

## مراحل نمونه گیری:

- جهت نمونه گیری از موكوس نازوفارنكس، پزشک مربوطه و یا فرد مسئول نمونه گیری باید سواب را به آرامی وارد سوراخ بینی بیمار کرده و پس از 2-3 سانتی متر فرو کردن آن در بینی و رسیدن به انتهایی ترین بخش بینی آن را متوقف کرده و به سمت پایین که ناحیه نازوفارنكس می باشد متمایل کند. سپس چند لحظه سواب را نگه داشته و يك حرکت چرخشی داده تا ترشحات به آن جذب شوند و پس از آن سواب را خارج کند.
- پزشک مربوطه و یا فرد مسئول نمونه گیری می بایستی سواب را بلافاصله به محیط منتقل کند. از هر بیمار باید 2 سواب گرفته شود (يك سواب برای انجام آزمایش کشت و دیگری برای انجام آزمون PCR). فرد مسئول باید سواب را در عمق محیط ترانسپورت فرو برده و قسمتی از سواب که با دست آلوده شده است را شکسته و سپس درب محیط را ببندد. سپس آنرا در داخل يك نایلکس حاوی پنبه مرطوب قرار داده و درب نایلکس را هم محکم ببندد. سپس نمونه را طبق دستورالعمل شماره **LA-WI-402** به آزمایشگاه ارسال نماید.
- **در مورد نوزادان و کودکانی** که نمونه گیری از آنها بطریق فوق امکان پذیر نمی باشد و با مشکل روبرو هستیم، فرد مسئول باید پلیت حاوی محیط کشت (برده ژانگو آنتی بیوتیک دار) را جلو دهان نوزاد با فاصله 10 سانتی متری در هنگام سرفه های شدید کودک نگه داشته و پس از حداقل 3 بار سرفه کردن درب پلیت را بسته و دور آنرا چسب بزند. سپس می بایستی پلیت را در داخل يك نایلکس حاوی پنبه نم دار قرار داده و درب نایلکس را محکم ببندد و در  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت 2 روز انکوبه کند. پس از آن سریعاً نمونه را طبق دستورالعمل شماره **LA-WI-402** به آزمایشگاه ارسال کند.





### نکات ایمنی:

- نمونه گیری حتماً توسط پزشک یا فرد متخصص انجام شود.
- فرد مسئول نمونه گیری می بایستی از دستکش و ماسک استفاده کند.
- مسئولین مربوطه باید واکسینه شده باشند.
- نمونه گیری مستقیم باید در مکان مخصوص نمونه گیری انجام گیرد.

از آنجاییکه باکتری بوردتلا پرتوسیسی نسبت به خشکی و شرایط محیط بسیار حساس است باید نمونه های مشکوک به سیاه سرفه که طبق دستورالعمل شماره LA-WI-401 از بیمار بر روی محیط ترانسپورت گرفته شده است، هر چه سریعتر به آزمایشگاه ارسال شوند. شرایط ارسال نمونه های جمع آوری شده به شرح ذیل می باشد:

- در صورتی که ارسال نمونه ها بلافاصله پس از نمونه گیری انجام شود نمونه های جمع آوری شده باید توسط مسئول مربوطه حداکثر ظرف 4 ساعت به آزمایشگاه ارسال شوند. در این صورت نمونه ها را می توان در دمای محیط نگهداری و در داخل ظرف درب دار حاوی پنبه نم دار به آزمایشگاه انتقال داد.

- اگر امکان ارسال نمونه ها به آزمایشگاه بلافاصله پس از نمونه گیری فراهم نباشد، فرد مسئول نمونه گیری می بایستی نمونه های جمع آوری شده در محیط ترانسپورت را ابتدا 2 روز در انکوباتور در دمای  $35^{\circ}\text{C}$

انکوبه کرده و پس از انکوباسیون نمونه ها را می توان در دمای اتاق حداکثر طی 3 روز (72 ساعت) به آزمایشگاه ارسال کند. در این صورت فرد مسئول باید درب لوله ها را کاملا محکم بسته و این مجموعه را در داخل یک نایلکس حاوی پنبه مرطوب قرار داده و همراه با فرم تکمیل شده اطلاعات بیمار هر چه سریعتر به آزمایشگاه مرجع ارسال کند.

- اگر پیش بینی می شود که ارسال نمونه ها به آزمایشگاه بیش از 72 ساعت طول می کشد، جهت انتقال نمونه فرد مسئول ابتدا باید نمونه های جمع آوری شده در محیط ترانسپورت را به مدت 2 روز در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کرده و سپس با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال دهد. در این صورت نمونه ها تا 8 روز قابلیت نگهداری خواهند داشت.

- چنانچه پلیت حاوی نمونه گرفته شده از سرفه نوزاد (cough plate) باید ارسال گردد (دستورالعمل شماره LA-FO-401)، فرد مسئول ابتدا باید پلیت را داخل نایلکس حاوی پنبه مرطوب به مدت 2 روز در  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه کرده و پس از این انکوباسیون نمونه را سریعا با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ارسال کند.

#### • نکات ایمنی:

- فرد حامل نمونه باید حتما از دستکش استفاده کند.
- مصرف محیط ترانسپورت مورد استفاده باید تاریخ مصرف داشته باشد.
- نحوه بسته بندی و ارسال نمونه به آزمایشگاه باید طبق دستورالعمل آزمایشگاه مرجع سلامت و بر اساس بسته بندی سه لایه انجام شود.

**آدرس:** تهران، میدان پاستور، انستیتوی پاستور ایران، بخش میکروشناسی،  
آزمایشگاه کشوری سیاه سرفه  
تلفکس: 66405535

## لیتوسپیروز

### نمونه های مورد نیاز در امر تشخیص و نحوه ارسال نمونه های مشکوک به لیتوسپیروز به آزمایشگاه:

در صورت شک به بیماری در دام یا انسان و به منظور ارسال نمونه به آزمایشگاه اکیدا توصیه می شود قبل از هر اقدامی با آزمایشگاه تماس گرفته و هماهنگی لازم بعمل آید تا نمونه در شرایط استاندارد تحویل آزمایشگاه گردد.

نمونه های مورد نیاز جهت ارسال به آزمایشگاه:

1) سرم خون: در اغلب موارد تنها نمونه مورد نیاز جهت تشخیص بیماری، سرم خون بیمار می باشد. برای تهیه این نمونه کافی است حدود 4 میلی لیتر خون کامل در لوله های ساده و بدون ماده ضد انعقاد اخذ و پس از حدود یک ساعت نگهداری در دمای اتاق، سرم آن مستقیماً به یک لوله اپندروف منتقل گردد. ظرف اپندروف که حاوی حدود یک میلی لیتر سرم خون می باشد را در مجاورت یخ قرار داده (فلاکس حاوی یخ خشک) و همراه با برچسب و نامه ای که حاوی مشخصات کامل بیمار و مبدأ ارسال کننده باشد به آزمایشگاه ارسال گردد. بهتر است همراه هر نمونه ارسالی فرم مخصوص ارسال نمونه تکمیل و به آزمایشگاه ارسال گردد.

2) ادرار (برای جداسازی باکتری): در شرایط بهداشتی و تمیز مقدار 10 تا 25 میلی لیتر از وسط جریان ادرار (Mid-stream urine sample) در ظروف استریل درپوش دار تهیه می شود، ادرار جمع آوری شده به دو قسمت تقسیم و یک قسمت آن به ظرف استریل دیگری منتقل شده و به آن 0.5% تا 1% فرمالین خالص فیلتر شده افزوده می شود (100 میکرولیتر فرمالین + 10 میلی لیتر ادرار). هر دو ظرف نمونه ادرار با هماهنگی قبلی به آزمایشگاه ارسال می شود. نمونه های ادرار (به منظور آزمایش مستقیم و یا کشت) در ظروف محکم محتوی یخ و دور از تابش نور همراه با نامه ای که مشخصات صاحب نمونه و آدرس و تلفن وی بر روی آن نوشته می شود در کوتاهترین زمان ممکن (کمتر از یک ساعت) به آزمایشگاه ارسال گردد.

توجه: نمونه ادرار حتماً قبل از شروع درمان با آنتی بیوتیک باید اخذ شود تا امکان جداسازی و یا مشاهده باکتری لیتوسپیروز میسر شود.

نکته مهم: با توجه به دوام کوتاه مدت باکتری در نمونه ادرار؛ قبل از اخذ نمونه حتماً با آزمایشگاه هماهنگی شود؛ تا از آماده بودن مقدمات آزمایش مطمئن شوید

## بورلیا:

### نمونه های مورد نیاز در امر تشخیص و نحوه ارسال نمونه های مشکوک به بورلیا (تب راجعه) به آزمایشگاه:

اقدامات الزامی آزمایشگاهی در مواقع مواجهه با حالت طغیان بیماری تب راجعه (بورلیا)

- تهیه مقدار 2 سی سی نمونه خون سیتراته و 2 عدد گسترش لام خون محیطی از کلیه افراد مشکوک

- ارسال سریع نمونه های خونی و یکعدد لام خونی محیطی به انستیتو پاستور ایران

## فلج شل حاد

### نمونه های مورد نیاز در امر تشخیص و نحوه ارسال نمونه های مشکوک به فلج شل حاد به آزمایشگاه:

#### تشخیص آزمایشگاهی:

اگر تعداد موارد مبتلا به فلج اطفال کم باشد، تشخیص موارد مبتلا به پولیومیلیت از سایر علل فلجی توسط آزمایشگاه صورت می گیرد.

بر اساس توصیه سازمان جهانی بهداشت، تشخیص آزمایشگاهی با جدا کردن ویروس از مدفوع بیمار انجام می پذیرد. چون دفع ویروس در مدفوع متغیر است باید ۲ نمونه مدفوع بفاصله ۲۴ ساعت از یکدیگر گرفته شود. ویروس وحشی پولیو تنها علت بروز فلج اطفال نیست. بندرت

#### نمونه مناسب:

- حداقل حدود ۱۰ گرم باشد (باندازه ناخن شست دست)
- نمونه ها بفاصله ۲۴ ساعت از یکدیگر گرفته شود، اگر بیمار قادر به دفع مدفوع نیست می توان سواب رکتال تهیه کرد.
- نمونه ها یا سواب را باید داخل ظرفهای استریل شیشه ای یا پلاستیکی درب پیچ دار قرارداد.
- نمونه ها باید در ۸-۴ درجه سانتیگراد حمل شود یا در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود بنابراین برای حمل نمونه ها باید کلدباکس و آیس پک در دسترس باشد.
- نمونه ها باید حداکثر ظرف ۱۴ روز پس از بروز فلج از بیمار تهیه شود.
- نمونه ها با رعایت زنجیره سرما و طی حداکثر ۷۲ ساعت به آزمایشگاه واصل گردد.

## نمونه های مورد نیاز در امر تشخیص و نحوه ارسال نمونه های مشکوک به SARS به آزمایشگاه:

### احتیاط در تهیه نمونه

نمونه های کوروناویروس MERS برای حمل و نقل در گروه B مواد بیولوژیک قرار دارند.

اعضای تیم بهداشتی درمانی که نمونه را تهیه می کنند باید از وسائل حفاظت شخصی استفاده نمایند

ماسک FFP3، عینک، گان، دستکش

اعضای تیم بهداشتی درمانی که در جابجایی نمونه شرکت دارند باید در مورد اصول بهداشتی آموزش کافی دیده باشند.

### انواع نمونه توصیه شده

۱. نمونه های ترشحات تنفسی تحتانی (خلط، آسپیره ترشحات نای، شستشوی ترشحات برونش): بیشترین تیترو ویروس
۲. ترشحات فوقانی دستگاه تنفس: علی الخصوص هنگامی که امکان تهیه نمونه از ترشحات تحتانی وجود نداشته باشد
۳. سرم: دو نمونه به فاصله حداقل ۳ هفته از همدیگر (تا اطلاع ثانوی و معرفی روش سرولوژی معتبر در فریزر نگهداری می شود). نمونه اول در هفته اول بیماری تهیه می گردد
۴. مدفوع: در کنار سرم و نمونه ترشحات تحتانی تنفسی از نمونه های ارجح محسوب می شود. اما تا اطلاع ثانوی ارسال نگردد.

## میزان لازم از هر نمونه

✓ مایع پلور، آسپیره ترشحات نای، شستشوی آلوئول و کیسه های هوایی  
(Bronchoalveolar lavage):

در یک ظرف غیرقابل نشت، استریل، دارای درب پیچ شونده مخصوص  
جمع آوری خلط، ۲ الی ۳ سی سی از این مایعات را بریزید.

✓ خلط:

از بیمار بخواهید تا مقداری آب را در دهان غرغره نماید و سپس با  
یک سرفه قوی و عمیق ترشحات خلط عمقی خود را از گلو  
مستقیماً به درون ظرف استریل و غیرقابل نشت (دارای درب  
پیچدار) بریزد.

## تهیه نمونه خلط مناسب



## تهیه نمونه خلط مناسب

درب ظرف را باز کرده نفس عمیقی را از راه بینی کشیده و برای لحظه ای نفس خود را در سینه حبس کنید و با سرفه عمیق خلط خود را داخل ظرف مربوطه تخلیه نمایید.

2



سعی شود خلط با آب دهان مخلوط نگردد و یا آب دهان به جای خلط داده نشود. (آب دهان شفاف و رقیق است ولی خلط چسبندگی دارد.)

### میزان لازم از هر نمونه

✓ سواب حلقی:

✓ فقط از سواب های با الیاف مصنوعی و دسته پلاستیکی استفاده شود.

✓ از سواب های دارای آلزینات کلسیم و سواب های دارای دسته چوبی استفاده نگردد!

✓ سرم: حداقل نمونه سرم که برای آزمایش لازم می شود ۲۰۰ میکرولیتر است. {آزسانتریفیوژ ۵ تا ۱۰ سی سی خون کامل بدست می آید}

✓ نمونه سرم در سرمای یخچال نگهداری و منتقل می شود.

✓ منجمد نمودن و جابجایی نمونه منجمد نیز قابل انجام است.

## سرعت و تاخیر در انتقال

- برای انتقال در مدت زمان کوتاه باید نمونه تهیه شده را در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری و در سریعترین زمان ممکن (در عرض ۲۴ الی ۷۲ ساعت؛ ترجیحاً ۲۴ ساعت) منتقل نمود.
- اگر در ارسال نمونه ممکن است تاخیری ایجاد گردد پس از تهیه نمونه، آنرا در اولین فرصت در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید (در مورد سواب نیاز به انجماد نیست)

## حمل و نقل نمونه

- نمونه های بیماران مشکوک باید بر اساس دستورالعمل های انجمن حمل و نقل هوایی بین المللی (IATA) بسته بندی و حمل و نقل گردند.
- اگر در ارسال نمونه ها تاخیر وجود دارد و باید نمونه را به مدت زیاد برای مسافت های طولانی حمل و نقل نمود، می توان بطور ترکیبی از یخ خشک (جهت انجماد) و ice-pack ژلی استفاده نمود
- ice-pack های ژلی در صورت تمام شدن یخ خشک می توانند به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت بیشتر، نمونه را در سرمای حرارت ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد حفظ نمایند.



## فهرست عناوین

ردیف	عنوان	صفحه
1-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به ایبولا.....	2.....
2-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به CCHF.....	11.....
3-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به کورونا ویروس.....	12.....
4-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به بوتولسم.....	20.....
5-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به منتقله از آب و غذا.....	21.....
6-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به سیاه زخم.....	25.....
7-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به سرخک، سرخچه و اوریون.....	26.....
8-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به مننژیت.....	31.....
9-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به دیفتیری.....	33.....
10-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به سیاه سرفه.....	39.....
11-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به لپتوسپیروز.....	43.....
12-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به تب راجعه (بورلیا).....	44.....
13-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به فلج شل حاد.....	44.....
14-	دستور العمل نحوه نمونه گیری و انتقال نمونه مشکوک به SARS.....	45.....