



جمهوری اسلامی ایران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی



معاونت بهداشت

شماره: 304/5126 د

تاریخ: 1392/05/10

پیوست ندارد

معاون محترم بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ...

موضوع: نحوه تهیه نمونه از بیماران مبتلا به کوروناویروس

با سلام و احترام

با توجه به نزدیک بودن ایام حج تمتع و احتمال اکتساب کوروناویروس MERS توسط زائرین، و جدی بودن امر تشخیص صحیح موارد محتمل و قطعی دستورالعملی در رابطه با تهیه نمونه صحیح و ارسال مناسب آن به آزمایشگاه ملی آنفلوانزا تهیه و به پیوست ارسال می گردد. لطفا دستورفرمایدین دستورالعمل جهت استفاده در کلیه بیمارستان های بستری کننده بیماران با علائم SARI توزیع گردد

دکتر محمد مهدی گویا

مشاور معاون بهداشت
ریس مرکز مدیریت بیماریهای واگیر



رونوشت:

تهیه نمونه و جابجایی آن:

موازین دستورالعمل کنترل عفونت را هنگام تهیه نمونه باید بدرستی رعایت نمود. بر اساس اطلاعات موجود بیشترین تیترو 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 صورت شک به این بیماری باید دو نمونه سرم نیز از بیمار تهیه شود و تا زمانی که امکان انجام آزمایشات سرولوژیک فراهم شود 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).

نمونه هایی که برای بررسی از نظر وجود کوروناویروس به آزمایشگاه دیگری ارسال می شوند باید در ابتدا از نظر وجود سایر میکروارگانیسم ها بررسی شود.

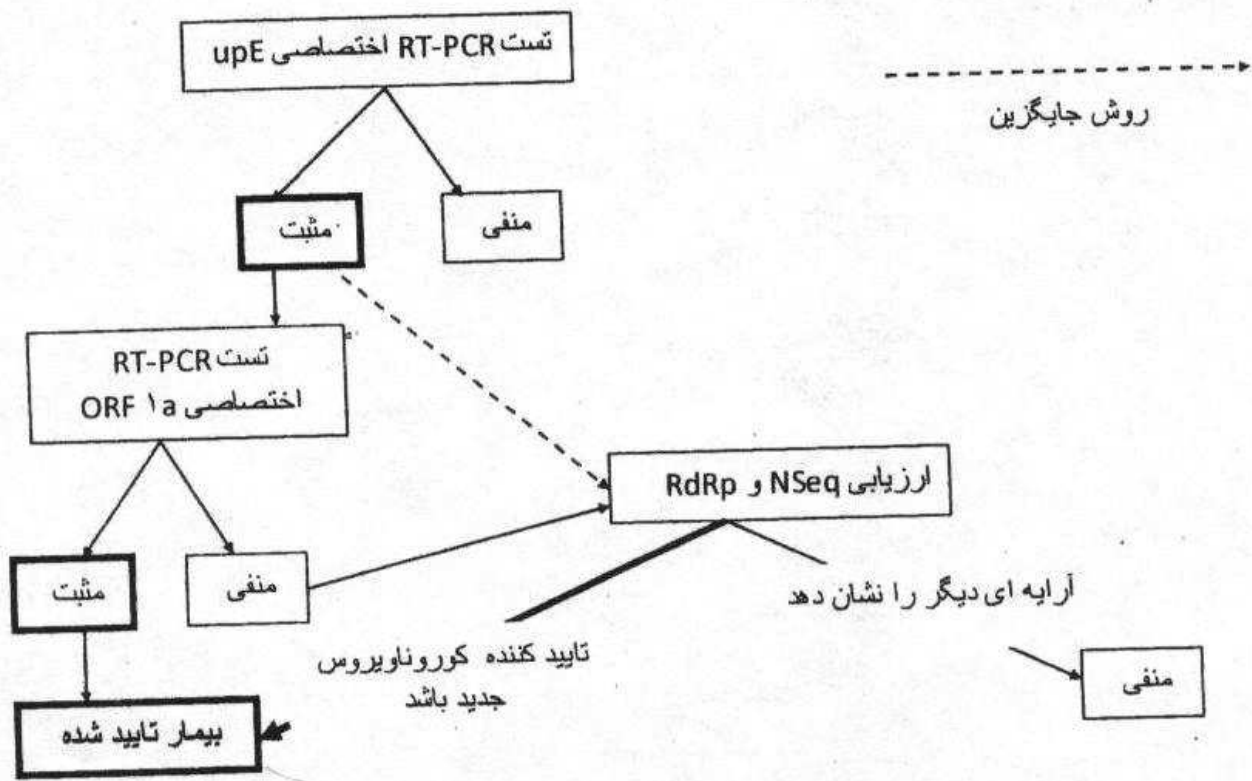
در جدول ۱ نام نمونه هایی که می توان از بیمار مشکوک تهیه نمود و اقدامات مورد نیاز برای ذخیره سازی و انتقال آنها ذکر شده است.

نمونه ها باید در اسرع وقت به آزمایشگاه رسانده شود (ترجیحا در عرض ۲۴ ساعت). وقتی احتمال می رود در ساندن نمونه ترشحات تنفسی یا سرم بیمار به آزمایشگاه تاخیر ایجاد شود، توصیه می شود نمونه ها را بر روی یخ خشک بصورت فریز نگهداری نمود.

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 بر روی یخ خشک فریز 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 بر روی یخ خشک فریز 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 بر روی یخ خشک فریز 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).	مواد بیولوژیک، گروه B	

بعلاوه، محل های هدف متعددی بر روی ژنوم کوروناویروس MERS-CoV برای شناسایی و تایید تشخیص معرفی شده اند که در ژن های RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) و NSeq (nucleocapsid protein) وجود دارند. اطلاعات بیشتر در مورد این روشها در سایت انستیتو ویروس شناسی Bonn آلمان وجود دارد.

الگوریتم ذیل تست های مورد استفاده جهت بررسی بیماران را نشان می دهد.



وقتی با دو روش که آرایه اختصاصی را بر روی ژنوم کوروناویروس جدید (MERS-CoV) بررسی می نمایند دو نتیجه ناهماهنگ بدست بیاید، می توان از ارزیابی آرایه ژنتیکی در قطعات دیگری از RNA ویروس، توسط روش PCR مناسب جهت تایید نتایج آزمایشات قبلی استفاده نمود.

هرچند روش هایی برای ارزیابی سرولوژیک بیان شده اند اما هنوز استفاده گسترده نیافته اند و هرگاه بتوان در سطح وسیع از آنها استفاده نمود، در دستورالعمل های آینده توصیه های لازم در مورد بهره گیری از روشهای سرولوژیک در تشخیص کوروناویروس MERS-CoV منتشر خواهد شد. روشی که فعلا استفاده می شود ارزیابی ایمنووفلورسنس (IFA) به روش معمول (۲۴ ساعته) و یا سریع (۳ ساعته) است. از روشهای سرولوژیک بعنوان روشهای تاییدی در افراد دارای ارتباط اپیدمیولوژیک با بیمار (افراد خانوار یا همکاران تماس یافته با بیمار) استفاده می شود. در تجربه بیماری سارس نشان داده شد که شواهد سرولوژیک بعد از ۱۰ روز پس از شروع بیماری بروز پیدا می کنند و تایید وجود RNA ویروس در ترشحات تنفسی بیماران با تست RT-PCR پس از ۱۵ روز تقریبا ناممکن می گردد. از آنجا که احتمال واکنش متقاطع وجود دارد استفاده از وسترن بلات نیز به تعداد بیماران بیشتری دارد تا بتوان تست مناسب را معرفی نمود.

لازم به ذکر است در بیماران علامتدار تنها به صرف وجود مجموعه ای از چند جواب منفی نمی توان تشخیص را رد نمود. دلایلی که می تواند باعث وجود جواب منفی کاذب گردد عبارتند از:

- کیفیت پائین نمونه تهیه شده مانند آلوده شدن نمونه ترشحات تنفسی با مواد موجود در حفره دهانی-حلقی

• مایع پلور، اسپیره ترشحات نای، شستشوی الونول و کیسه های هوایی (Bronchoalveolar lavage)

در یک ظرف غیرقابل نشسته 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 نشسته (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.

II. دستگاه تنفس تحتانی

• سواب دهانی حلقی (Oropharyngeal) و بینی حلقی (Nasopharyngeal):

تنها 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 چرا که دارای موادی هستند که ویروس ها 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 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.

○ 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.

○ 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 نشسته 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.

۲. خون:

• سرم:

برای آزمایش آنتی بادی های سرم لازم می شود نمونه سرم 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.

- نمونه در مراحل خیلی زود یا خیلی دیر در سیر بیماری تهیه شده باشد
- حمل و نقل و نگهداری نمونه بدرستی انجام نشده باشد
- دلایل تکنیکی منجر به منفی شدن نمونه

هرگاه نمای کلینیکی بیماری و جوانب اپیدمیولوژیک بیماری مطرح کننده عفونت با کوروناویروس جدید (MERS-CoV) باشد اما نتایج PCR منفی گزارش شود می توان از روشهای سرولوژیک برای تایید تشخیص استفاده نمود و اهمیت تهیه "دو نمونه" جهت بررسی سرولوژیک در اینجا نمایان می گردد.

تفسیر نتایج آزمایشات:

برای اینکه بتوان بیماری را مورد تایید شده نامید باید یکی از شرایط ذیل محقق شده باشد:

- آزمایش PCR برای حداقل دو آرایه اختصاصی ژنتیکی متفاوت مثبت شده باشد؛ یا
- آزمایش PCR برای یک آرایه اختصاصی ویروس MERS-CoV مثبت شده باشد و یک آرایه متفاوت دیگر که نشانگر کوروناویروس جدید باشد نیز مثبت گردد.

مثبت شدن تنها یک آرایه اختصاصی برای کوروناویروس MERS-CoV، تایید کننده تشخیص نهایی نیست بلکه برای تعریف "مورد محتمل" یک معیار محسوب می شود. سایر معیارهای کلینیکی و اپیدمیولوژیک در مبحث "تعاریف موارد بیماری" آورده شده است.

قبل از تهیه و ارسال نمونه باید مطمئن بود که بر اساس تعاریف ارائه شده بیمار مورد نظر مورد "مشکوک کوروناویروس MERS" می باشد.

نمونه های مورد نظر و اولویت های نمونه گیری:

برای افزایش احتمال تشخیص عفونت توصیه می شود نمونه های متعدد از محل های مختلف عفونی شده تهیه گردد. برای مثال یک نمونه از دستگاه تنفسی فوقانی توسط سواب بینی حلقی (Nasopharyngeal) و یک نمونه از ترشحات دستگاه تنفس تحتانی (به عنوان مثال نمونه خلط) تهیه شود. تا جاییکه امکان دارد نمونه ها در زمان های مختلف تهیه شوند.

نمونه ترشحات تنفسی تحتانی و مدفوع برای جمع آوری از بیمار ارجح هستند.

برای انتقال در مدت زمان کوتاه باید نمونه تهیه شده را در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری و به سریعترین زمان (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 نمایند (با توجه به موارد استثناء که در ادامه بیان خواهند شد).

بر روی هر نمونه تهیه شده از بیمار باید تاریخ تهیه نمونه، نوع نمونه تهیه شده و کد مشخصه بیمار ذکر شوند.

۱. جمع آوری نمونه از دستگاه تنفسی بیمار

۱. دستگاه تنفسی تحتانی:

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 جابجایی نمونه منجمد نیز قابل انجام است.

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

• پلاسما (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.

۳. مدفوع:

مقدار ۲ تا ۵ گرم مدفوع (آبکی یا غیرآبکی) را ظرف استریل مخصوص جمع آوری خلط که درب پیچدار داشته و غیرقابل نشت باشد جمع آوری نمائید. 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.

۴. حمل و نقل نمونه:

نمونه های بیماران مشکوک به عفونت کوروناویروس جدید 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 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.