



In the name of Allah
به نام خداوند بخشنده مهربان

مدیریت نمونه های مشکوک به عفونت هاری حمل و ارسال ایمن آن

دکتر روزبه بشر

سرپرست بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری

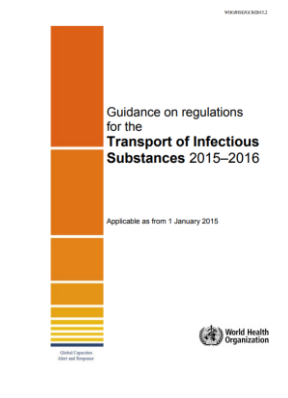
انستیتو پاستور ایران

آذر ماه ۱۳۹۸

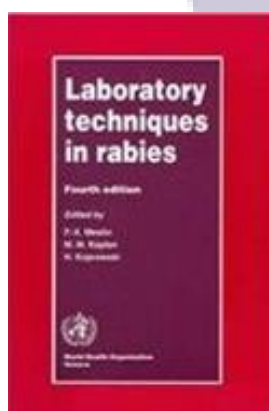
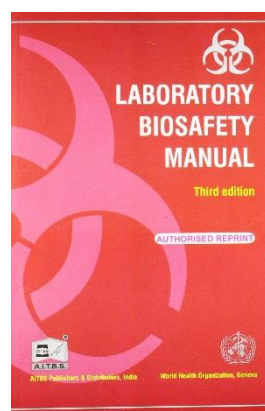
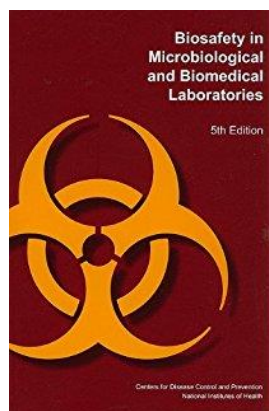
Dr. Rouzbeh Bashar
bashar@Pasteur.ac.ir



References

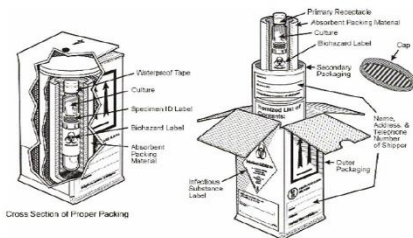


- **Transport of Infectious Substances 2015–2016, WHO**
- **Laboratory Techniques in Rabies, 4th Edition 1996, WHO**
- **Laboratory Biosafety Manual, Third Ed. 2004, WHO**
- **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5th Edition 2009, (CDC) USA**
- **IATA - Dangerous Goods Regulations (DGR) (54th Ed.) 2017, IATA**





ملاحظات ایمنی در نمونه برداری و روشهای تشخیص ویروس هاری



الزامات کلی کار در آزمایشگاهها و مراکز پزشکی و دامپزشکی در

ارتباط با ویروس هاری:

- واکسیناسیون کارکنان حداقل یکماه قبل از شروع به کار و تایید وجود حداقل 0.5 IU/ml پادتن در سرم افراد در سنجش های دوره ای ۶ ماهه (به منظور استمرار صلاحیت کار در واحدها).
- رعایت مقررات ایمنی زیستی حداقل سطح ۲ (BSL2) در آزمایشگاههای تشخیصی و سطح ۳ (BSL3) در تحقیقات و تولید (تکثیر ویروس در مقیاس زیاد).
- رعایت اصول ایمن نمونه برداری از بیماران مشکوک به هاری.
- رعایت دستورالعمل نحوه مواجهه با لاشه حیوانات وحشی (سازمان های دامپزشکی و حفاظت محیط زیست).
- رعایت اصول کالبدگشایی و نمونه برداری و معدوم سازی لاشه حیوانات.
- رعایت مقررات بسته بندی، حمل و انتقال مواد و نمونه های زیستی.

تشخیص بیماری هاری

تشخیص کلینیکی

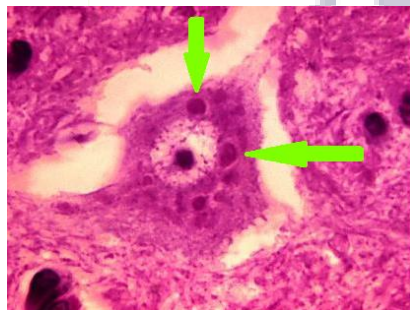
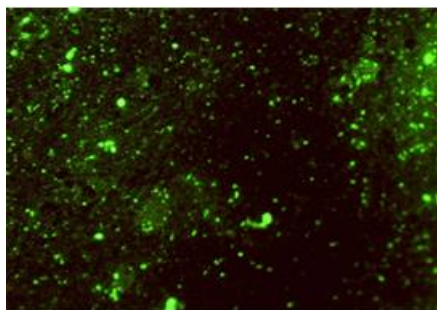
پس از بروز علائم بالینی:

علائم مشابه هاری: آنسفالیت هایی با منشاء غیر از هاری، سندروم گیلن باره، بوتولیسم، کزاز، مننژیت، CJD، مسمومیت با آتروپین، تومورهای مغزی، سکته مغزی، سایکوز، هیستری و گریز از آب کاذب.

نشانه های بالینی اصلی هاری: نشانه های نوروپاتیک و یا پارالیتیک بویژه فتو فوبیا، هیدروفوبیا و دیسفاژی توام با ریزش بزاق با سابقه گزش.

تشخیص آزمایشگاهی

- نمونه پیش از مرگ: فولیکول های مو در پوست ناحیه اتصال به گردن، قرنیه یا نمونه بزاق
- تشخیص بعد از مرگ: بافت مغز



تشخیص آزمایشگاهی هاری (تشخیص پس از مرگ)

مرجع تشخیص آزمایشگاهی بیماری هاری انستیتو پاستور ایران می باشد

• نمونه قابل قبول: نمونه مغز حیوان یا انسان مشکوک به هاری

• آزمون ها:

• Mouse Inoculation Test (MIT) & Direct Fluorescent Antibody Test (FAT)

• نمونه مشکوک باید ترجیحاً از بافت مغز تازه و در محیط ترانسپورت (گلیسرول ۵۰٪ در

محلول PBS) به آزمایشگاه ارسال شود.

❖ نمونه نباید در فرمالین یا الکل ارسال شود.

• با توجه به در دسترس بودن کیت های مخصوص نمونه برداری مغز با ایمنی بیشتر، بهتر است

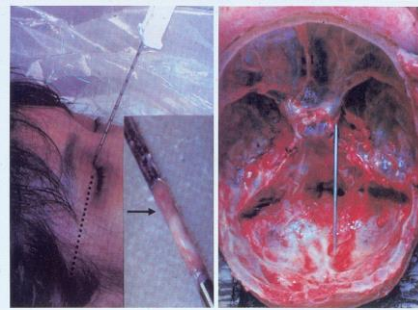
نمونه برداری به وسیله این کیت انجام و به آزمایشگاه ارسال شود.

• برای جدا کردن سر حیوان مشکوک به هاری، باید با رعایت اصول کلی کالبد گشایی، از

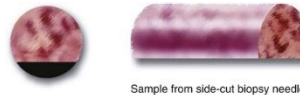
محل مهره اطلس (اولین مهره گردن) قطع شود.

• در انسان، بافت مغز توسط تکنیک آسپیراسیون سوزنی از درون حفره چشمی و یا سوراخ

بزرگ پس سری نمونه گیری می شود.



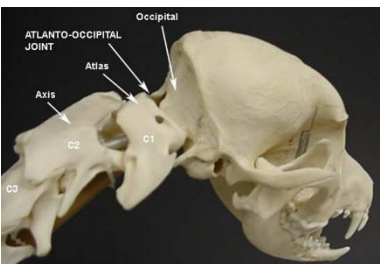
from Tong et al., The Lancet, 1999.



Sample from side-cut biopsy needle



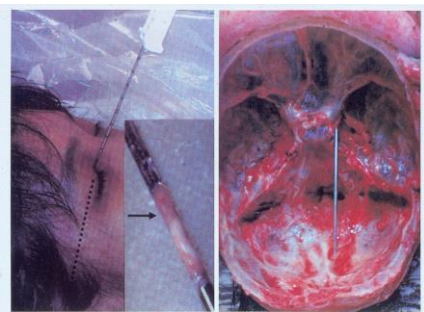
Sample from end-cut biopsy needle



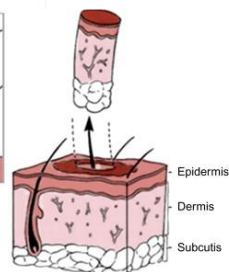
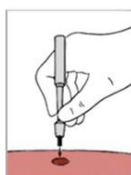
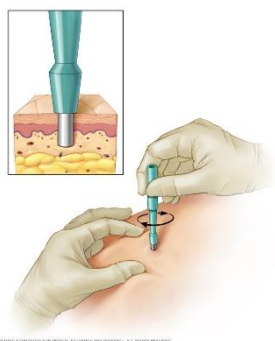
تشخیص آزمایشگاهی هاری (تشخیص پس از مرگ)

وسایل نمونه برداری

- سوزن بیوپسی (تروکات) برای نمونه برداری مغز از طریق سوراخ خلقی کره چشم
- پانچ برای نمونه برداری از پوست گردن

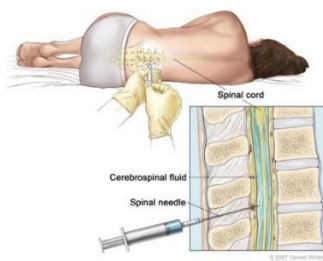
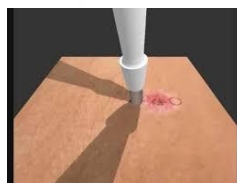


from Tong et al., The Lancet, 1999.



تشخیص آزمایشگاهی هاری (تشخیص پس از مرگ) (ادامه)

ملاحظات عمومی هنگام نمونه برداری



❖ استفاده از امکانات، تجهیزات ایمنی و حفاظت شخصی

• مکان کالبدشکافی و نمونه برداری باید قابل پاکسازی و ضدعفونی بوده و هر گونه احتمال نشت و آلودگی باید رفع گردد.

• سطوح انجام کار دو بار و هربار پس از ریخته شدن هرگونه آلودگی باید آلودگی زدایی شوند.

• هر گونه ماده آلوده باید در ظروف محکم و غیر قابل نفوذ ریخته شده و قبل از دوریختن، طبق دستور العمل ایمنی زیستی سازمان جهانی بهداشت آلودگی زدایی شوند.

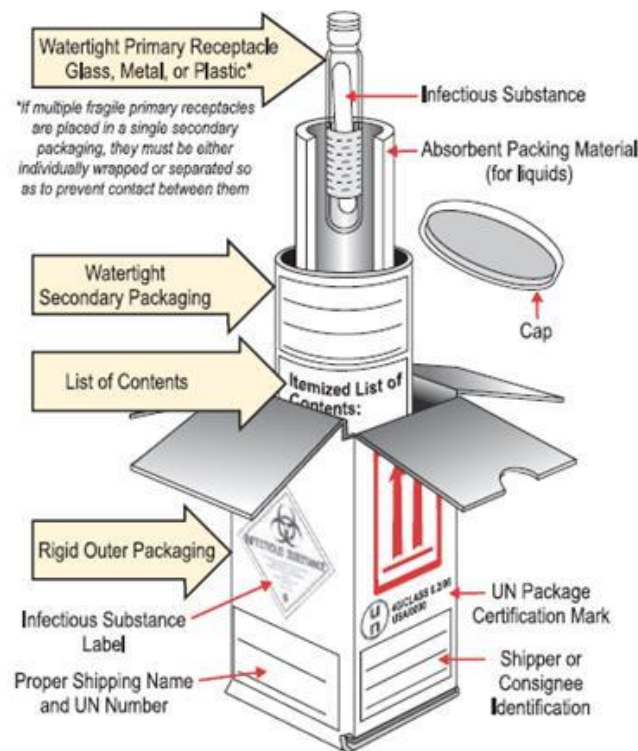
• تسهیلات لازم جهت ایمنی کار با وسایل تیز و برنده باید در نظر گرفته شود. استفاده از سرنگهای یکبار مصرف - جمع آوری سرسوزنها و وسایل تیز و برنده در ظروف غیر قابل نفوذ (safty box).

• اقدامات لازم به منظور ممانعت از انتشار آئروسول ها و یا خونابه و مایعات قابل تراوش از بیمار زنده یا فوت شده

تشخیص آزمایشگاهی هاری (تشخیص پس از مرگ) (ادامه)

Category A UN 2814 WHO Certified Packing System

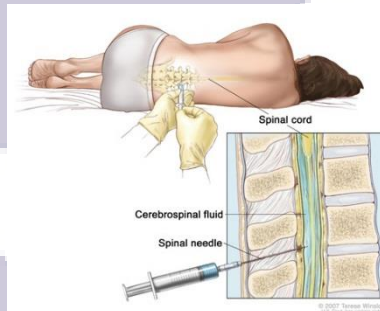
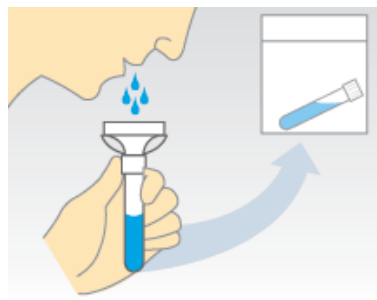
روش ارسال نمونه



- نمونه ابتدا در ظرفی غیرقابل نفوذ قرار داده می شود
- برای پیشگیری از صدمه خوردن، ظرف اول در یک لفاف مناسب پیچیده می شود.
- ظرف اول در یک ظرف دوم غیرقابل نفوذ دیگری قرار داده می شود.
- در ظرف دوم ماده جاذب مناسب مانند کاغذ یا بسته های جاذب الرطوبه قرار داده می شود.
- لیست محتویات نوشته شده و بین دو ظرف قرار داده می شود.
- ذکر وجود یخ خشک در محموله و مقدار آن بر حسب کیلوگرم همراه با نصب برچسب UN1845 و علامت مخصوص آن 
- ذکر مقدار ماده ارسالی، با کد UN 2814 روی برچسب بسته ارسالی مبنی بر محتوای عفونی موثر بر انسان و یا ذکر کد UN2900 عفونت موثر بر حیوان.
- نوشتن اسم و فامیل و تلفن شخص مسئول
- در صورتی که محموله مقداری بیشتر از ۵۰ میلی لیتر یا ۵۰ گرم از ماده عفونی گروه A دارد، بر روی ظرف خارجی آن برچسبی با این مضمون نصب می شود: «خطر، در هواپیمای مسافربری بارگیری نشود.»

تشخیص آزمایشگاهی هاری (تشخیص پیش از مرگ)

تشخیص آزمایشگاهی پیش از مرگ بیماری هاری عموماً در موارد انسانی انجام می شود

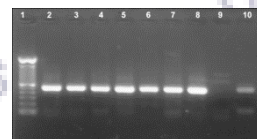
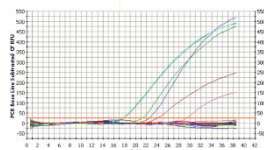


نمونه های قابل قبول:

- نمونه بزاق
- نمونه بیوپسی پوست
- نمونه سرم و مایع مغزی - نخاعی

آزمون ها:

- RT- PCR
- Real Time PCR
- RFFIT



تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

روش نمونه گیری



نمونه بزاق

- از بیمار با استفاده از دستکش و رعایت تمام موارد ایمنی، با استفاده از پپت پاستور پلاستیکی سه نمونهی بزاق هرکدام به میزان ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر به فاصله‌ی زمانی ۳-۶ ساعت گرفته شود و درون یک ظرف کاملا دربسته تمیز (فالكون، لوله آزمایش یا کرایوتیوپ) بدون هیچ ماده نگهدارنده و با رعایت زنجیره‌ی دمایی سرد (۴-۸ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه انتقال داده شود.
- **آسپیراسیون تراشه و خلط برای آزمایش هاری مناسب نیست.**
- آزمایشاتی که بر روی این نمونه‌ها، انجام می‌شود، عبارتند از: آزمایش تشخیص مولکولی RT-PCR, Real Time PCR به منظور تشخیص RNA ویروسی و کشت نمونه بزاق به منظور جداسازی ذرات عفونی ویروس

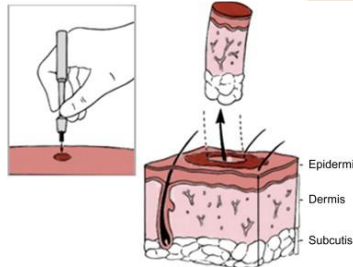
- نام بیمار
- تاریخ تهیه
- نوع نمونه

تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

روش نمونه گیری

نمونه بیوپسی پوست

- یک نمونه نسبتاً ضخیم پوست به قطر ۵ تا ۶ میلیمتر بایستی از ناحیه خلفی گردن در قسمت حدفاصل رویش مو، گرفته شود.
- نمونه بیوپسی پوست بایستی حداقل حاوی ۱۰ عدد فولیکول مو با عمق مناسب باشد که شامل اعصاب پوستی در قاعده فولیکولها است.
- بیوپسی های تهیه شده را بایستی به روی یک قطعه کوچک گاز استریل مرطوب (بدون آغشته بودن به محیط انتقال و یا رقیق کننده) گذارده و این مجموعه را درون یک ظرف انتقال کاملاً دربسته قرارداد و با حفظ زنجیره‌ی دمای سرد (ترجیحاً ۲۰ درجه زیر صفر و در صورت عدم امکان ۴-۸ درجه سانتیگراد) ارسال نمود.
- تستهای قابل انجام برای این نمونه عبارتند از: آزمایش ایمونوفلورسانس مستقیم و آزمایش تشخیص مولکولی.



تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

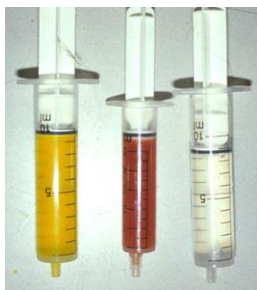
روش نمونه گیری

نمونه سرم و مایع مغزی - نخاعی

- حداقل به میزان 5 ml سرم و مایع مغزی - نخاعی برای آزمایش بایستی تهیه شود.
- چنانچه بیمار قبلاً سابقه ایمونیزاسیون علیه هاری داشته باشد، بایستی نمونه سرمی دیگری نیز چند روز پس از اولین نمونه گیری از وی تهیه شود تا تیترا بالارونده پادتن علیه هاری در وی مشخص گردد.
- تستهایی که روی این نمونه ها میتوان انجام داد عبارتند از: آزمون ایمونوفلورسنت غیرمستقیم و تست ارزیابی خنثی سازی ویروس (RFFIT) Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test.

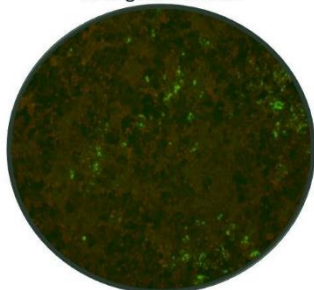
رعایت نکات ایمنی به هنگام گرفتن نمونه مایع نخاع:

- استفاده از عینک یا شیلد محافظ
- استفاده از ماسک
- پوشیدن دستکش دولایه
- رعایت نکات ایمنی به هنگام دفع سوزن و سرنگ آلوده

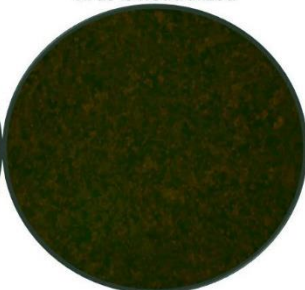


RFFIT slide microscopic fields

No antibody present -
virus grows in cells



Antibody present -
virus is neutralized



تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

روش ارسال نمونه (ادامه)

Category A UN 2814 WHO Certified Packing System

- مسئول نمونه گیری می باید نمونه را در بسته بندی استاندارد و دارای برچسب استاندارد
- و رعایت اصول ارسال ایمن نمونه، به آزمایشگاه رفرانس انستیتو پاستور تهران ارسال نماید.
- نمونه ها در زنجیره سرد (ترجیحا فریز شده) منتقل شوند.
- نمونه ها نباید در فرمالین یا هر ماده دیگری فیکس شود.
- به همراه نمونه ها یک فرم اطلاعات بیمار، و نامه درخواست آزمایش ارسال گردد.



تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

روش ارسال نمونه (ادامه)

Category A UN 2814 WHO Certified Packing System



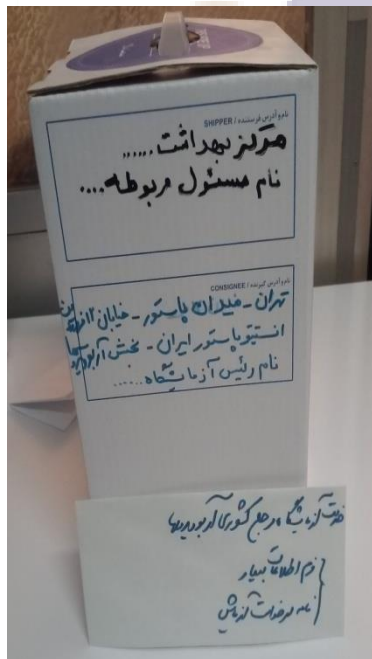
- بهترین زمان ارسال نمونه ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تهیه نمونه می باشد.
- نمونه ها توسط رابطین مراکز بهداشتی به آزمایشگاه منتقل گردند.
- قبل از ارسال نمونه با آزمایشگاه هماهنگ گردد.
- نمونه در ساعات اداری به آزمایشگاه تحویل داده شود.
- به همراه نمونه فرم اطلاعات، شرح حال و سابقه واکسیناسیون بیمار در صورت گزارش گزش ارسال گردد (فرم به صورت کامل و ترجیحا بصورت تایپی تکمیل شود)
- اطلاعات خواسته شده در فرم به درستی درج شوند..

تشخیص آزمایشگاهی هاری (پیش از مرگ) (ادامه)

روش ارسال نمونه (ادامه)

روی هر بسته باید اطلاعات زیر درج گردد:

- نام و آدرس فرستنده یا ارسال کننده کالا
- نام و آدرس حمل کننده کالا
- شماره تلفن و دورنگار شخص مسئول تایید شرایط بسته بندی نمونه
- نام و آدرس دریافت کننده (گیرنده) نمونه
- نوع نمونه به طور واضح و به تفکیک نام برده شود
- برچسب دارای علامت خطر زیستی



Thank you for your attention

