

دستورالعمل کشوری تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب دنگی

نسخه ۰۱

تیرماه ۱۴۰۳

آزمایشگاه مرجع سلامت

انستیتو پاستور ایران

(آزمایشگاه مرجع کشوری آربو ویروسها و تبهای خونریزی دهنده)

آقای دکتر کاظم وطن خواه

آقای دکتر محمدحسن پوریای ولی

خانم دکتر مرجان رهنمای فرزانی

آقای دکتر مصطفی صالحی وزیری

خانم دکتر کتابون خداوردیان

خانم دکتر تهمینه جلالی

خانم دکتر شهلا فارسی

خانم مهسا توکلی راد

آقای دکتر احمد قاسمی

آقای دکتر علیرضا دولت یار

خانم مریم میر محمدعلی رودکی

بخش اول : تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب دنگی

۱. مقدمه

ویروس دنگی، یک فلاوی ویروس^۱ از خانواده فلاویویریده^۲ است که شامل ۴ سروتیپ (دنگی ۱-۴) می باشد. ویروس دنگی شایعترین عفونت آربوویروسی در جهان می باشد، به طوریکه تخمین زده می شود سالانه ۴۰۰ میلیون نفر به این ویروس آلوده می گردند و در حال حاضر نیمی از جمعیت کره زمین در مناطق اندمیک دنگی زندگی می کنند. عفونت با ویروس دنگی یک بیماری منتقل شونده توسط ناقل (vector) می باشد که ناقلین اصلی آن پشه های *Aedes aegypti* و *Aedes albopictus* هستند و می تواند به صورت بدون علامت یا تحت بالینی، تب دنگی (فرم ملایم) و یا دنگی شدید (تب خونریزی دهنده دنگی و سندرم شوک دنگی) بروز یابد. به طور معمول موارد شدید بیماری متعاقب عفونت ثانویه بیمار با یک سروتایپ متفاوت ویروس دنگی رخ می دهد. تشخیص آزمایشگاهی ویروس دنگی برای مدیریت بالینی و درمان بیماران و همچنین کنترل طغیان/اپیدمی بیماری دارای اهمیت قابل توجهی می باشد.

۲. دامنه کاربرد:

این راهنما جهت معرفی انواع آزمایش های اختصاصی مورد استفاده برای تشخیص عفونت ویروس دنگی ، نحوه تفسیر و پیگیری نتایج و همچنین مدیریت نمونه بیماران مشکوک به این بیماری در مراکز تعیین شده توسط وزارت بهداشت، اعم از آزمایشگاه های شبکه بهداشت و مراکز بیمارستانی و پیش بیمارستانی، کاربرد دارد.

۳. تشخیص آزمایشگاهی :

۳.۱. کینتیک عفونت ویروس دنگی

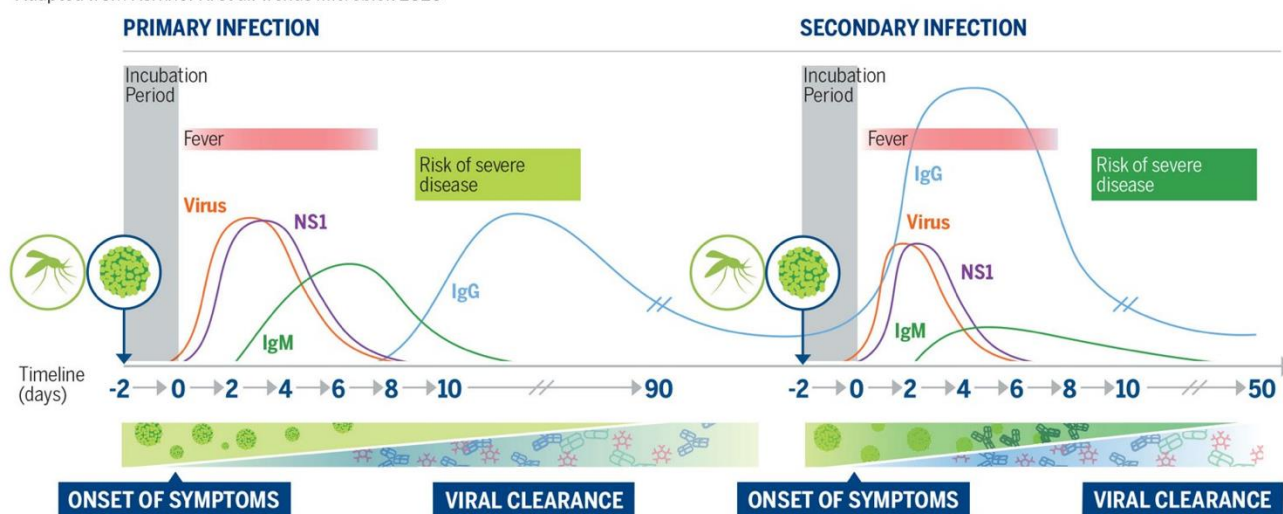
همان گونه که در شکل ۱ قابل مشاهده است، در عفونت اولیه (Primary infection)، حضور ویروس در خون (ویرمی) قبل از بروز علائم بالینی شروع شده و تا حدود ۱ هفته پس از آن ادامه دارد. آنتی بادی IgM از روز ۳ تا ۵ بعد از بروز علائم در

¹ Flavivirus

² Flaviviridae

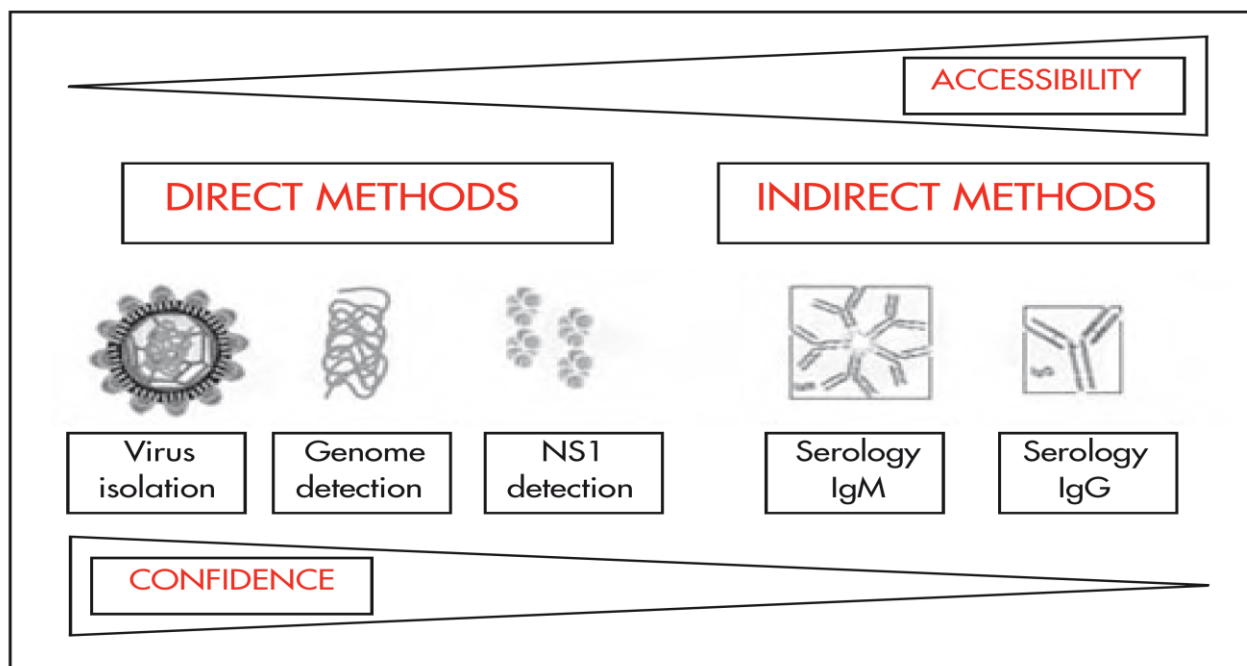
نمونه خون، سرم و پلاسما قابل شناسایی است و تا چندین ماه پایدار باقی می ماند. آنتی بادی IgG از هفته دوم بیماری در خون، سرم و پلاسما قابل ردیابی است و ممکن است تا آخر عمر پایدار باقی بماند. در عفونت های ثانویه (Secondary infection) به واسطه وجود سلول های خاطره سیستم ایمنی، آنتی بادی IgG از روز ۱ یا ۲ بعد از شروع علائم و با تیترا بالا قابل شناسایی است. در حالیکه آنتی بادی IgM با تاخیر و معمولاً با تیترا پایین قابل ردیابی باشد. الگوی ویرمی در عفونت های ثانویه و اولیه یکسان است ولی طول مدت زمان ویرمی در عفونت های ثانویه کوتاه تر است. بنابراین بهترین اهداف تشخیصی در هفته اول بیماری، شناسایی ویروس و اجزای آن (ژنوم و آنتی ژن ویروسی) و در هفته دوم آنتی بادی های ضد ویروس (IgM و IgG) می باشد (شکل ۲).

Adapted from Kerkhof K. et al. Trends Microbiol. 2020



شکل ۱. کینتیک عفونت ویروس دنگی در عفونت های اولیه و ثانویه

(<https://www.biomerieux.com/nl/en/our-offer/clinical-products/vidas-arboviruses-panel.html>)



شکل ۲. روشهای تشخیصی مستقیم (ویروس و اجزای آن) و غیر مستقیم (آنتی بادی های ضد ویروس) عفونت ویروس دنگی
(Source: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143157/pdf/Bookshelf_NBK143157.pdf)

۴. روش های مورد استفاده برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت ویروس دنگی

۴.۱.۱. کشت و جداسازی ویروس

جداسازی ویروس روش مرجع تشخیص بیماری است اما به دلیل سختی انجام و طولانی بودن زمان حصول نتیجه، انجام آن صرفاً محدود به آزمایشگاه مرجع بوده و برای مطالعاتی مانند بررسی میزان ویرولانسی و سایر ویژگی های ویروس به کار می رود. در این روش که پرکاربردترین روش برای جداسازی ویروس دنگی است، سلول پشه C6/36 (کلون شده از *Ae. albopictus*) یا AP61 (رده سلولی از *Ae. pseudoscutellaris*) سلول های انتخابی برای جداسازی روتین ویروس دنگی هستند. از آنجایی که ممکن است اثر سیتوپاتیک در سلولها مشاهده نشود، کشت سلولی باید برای شناسایی ژنوم یا آنتی ژن ویروس مورد بررسی قرار گیرند.

نمونه مورد نیاز برای کشت و جداسازی ویروس عبارتند از: سرم، پلاسما و سلول های تک هسته ای خون محیطی. همچنین نمونه های بافت نظیر کبد، ریه، غدد لنفاوی، تیموس و مغز استخوان نیز می توانند برای جداسازی ویروس استفاده شوند.

۴.۱.۲. شناسایی اسید نوکلئیک

روش های مولکولی مانند Real time RT-PCR برای یافتن اسید نوکلئیک ویروس در بیماران مشکوک در طول ۷ روز اول بیماری، برای تشخیص انجام می گیرد. شناسایی ژنوم ویروس بیانگر عفونت قطعی ویروس دنگی می باشد.

نمونه مورد نیاز برای تشخیص مولکولی ویروس دنگی، سرم (نمونه ارجح)، پلاسما، خون کامل، مایع مغزی نخاعی (CSF) در بیماران مبتلا به انسفالیت و نمونه بافت به ویژه در نمونه های اتوپسی (ترجیحا بافت کبد) است.

۴.۱.۳. شناسایی آنتی ژن NS1

آنتی ژن NS1 یا Non-structural Protein 1 در مرحله حاد عفونت با ویروس دنگی یعنی زمانی که ویرمی وجود دارد، در خون قابل تشخیص است و در هفته اول شروع علائم برای تشخیص بیماری حساسیت بالا و مشابه روش های مولکولی را دارد. این آنتی ژن در بعضی از بیماران پس از هفته اول و معمولا تا روز ۹ بیماری نیز قابل شناسایی می باشد. به طور کلی شناسایی آنتی ژن NS1 در حال حاضر با روش های ELISA و تشخیص سریع انجام می شود.

نمونه مورد نیاز: برای شناسایی NS1 سرم (نمونه ارجح)، پلاسما، و خون کامل (فقط برای تست تشخیص سریع) می باشد. مشابه کشت ویروس و تشخیص مولکولی، شناسایی NS1 نیز تایید کننده عفونت قطعی با ویروس دنگی می باشد. برای شناسایی آنتی ژن ویروس در نمونه های بافت فیکس شده می توان از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده نمود.

نمونه مورد نیاز: بافت فیکس شده کبد، کلیه، طحال و ریه برای آزمایش بافتی ویروس دنگی مطلوب هستند. هر چند در موارد مرگ به دلیل نامشخص که احتمال بیماری عفونی با درگیری چند سیستم در آن مطرح است، توصیه می شود که از کلیه ارگان های اصلی، به ویژه ارگان هایی که دارای هر گونه یافته پاتولوژیک قابل توجه هستند، نمونه تهیه شود.

۴.۱.۴. شناسایی IgG و IgM اختصاصی

شناسایی آنتی بادی های اختصاصی ویروس دنگی معمولا با روش ELISA و روش های تشخیص سریع انجام می شود اگر چه سایر روشهای سرولوژیک نظیر ایمونوفلورسانس نیز می تواند به این منظور مورد استفاده قرار گیرد. **نمونه مورد نیاز:** برای شناسایی IgM و IgG، سرم (ارجح) و پلاسما و خون کامل (فقط برای تست تشخیص سریع) می باشد. آزمایش IgM را می توان روی نمونه CSF نیز انجام داد. نمونه CSF تنها برای بیماران مبتلا به انسفالیت توصیه می شود. الگوی شناسایی آنتی بادی های IgM و IgG در عفونت های اولیه و ثانویه متفاوت می باشد.

۴.۱.۴.۱. عفونت اولیه با ویروس دنگی:

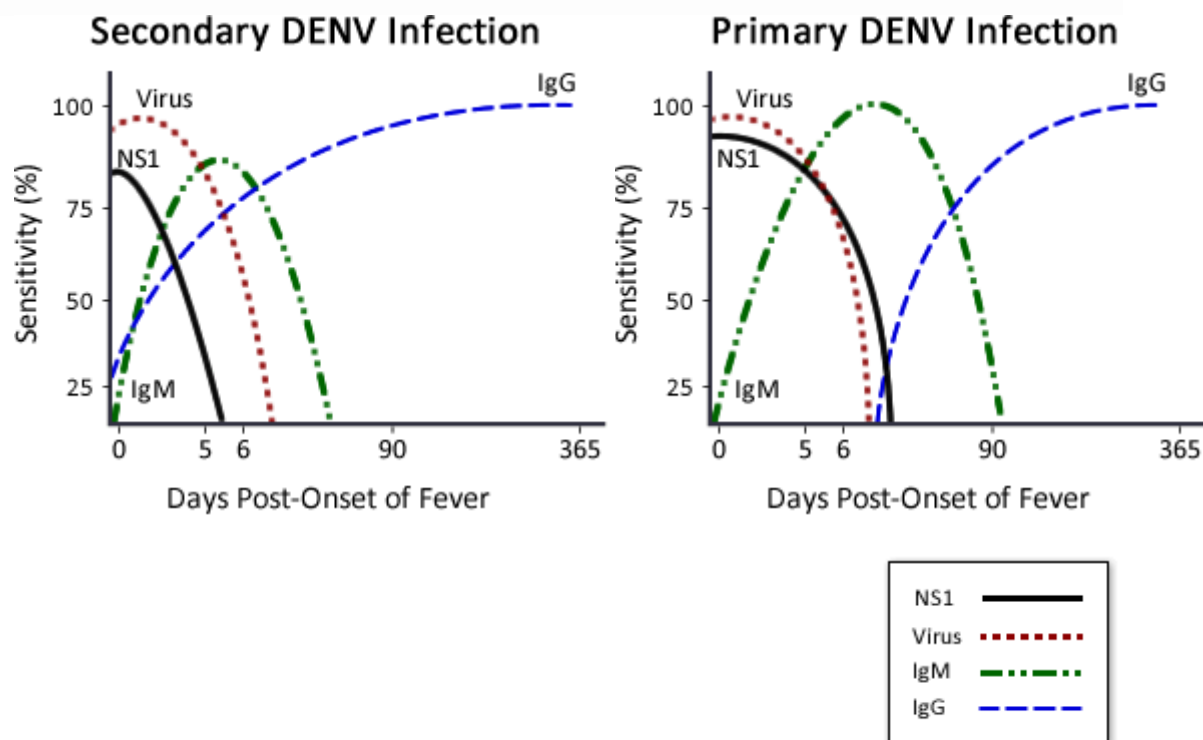
در افرادی که سابقه هیچ گونه ابتلا به فلاوی ویروس ها را نداشته یا در برابر آنها واکسینه نشده اند، آنتی بادی IgM از ۳ تا ۵ روز پس از شروع علائم در ۵۰ درصد بیماران قابل شناسایی و تا روز دهم در ۹۹ درصد موارد قابل سنجش است. تیتراژ آنتی بادی پس از آن تدریجا کاهش پیدا می کند و پس از گذشت ۱۲ هفته به سطح غیر قابل سنجش می رسد. در این بیماران آنتی بادی IgG با تأخیر چند روز نسبت به آنتی بادی IgM در خون قابل شناسایی است، مقدار آن تدریجا افزایش پیدا می کند و برای ماه ها و اغلب در تمام عمر مثبت می ماند.

۴.۱.۴.۲. عفونت ثانویه با ویروس دنگی :

در این موارد که بیمار سابقه ابتلا قبلی به ویروس دنگی یا سایر فلاوی ویروس ها را داشته است، تیتراژ آنتی بادی ها سریعا افزایش می یابد اما تیتراژ آنتی بادی IgM کمتر از عفونت های اولیه یا در مواردی غیر قابل سنجش است و پاسخ غالب با آنتی بادی IgG است. به همین ترتیب مدت زمان ویرمی و مثبت بودن آزمایش NS1 نیز در عفونت های ثانویه کوتاه تر می باشد.

سطح بالای آنتی بادی IgG در فاز حاد بیماری احتمال عفونت ثانویه را مطرح می کند اما برای تأیید لازم است در نمونه فاز نقاهت حداقل ۴ برابر افزایش داشته باشد.

با توجه به اهمیت به حداقل رساندن اثر عوامل مداخله گر روش توصیه شده برای اندازه گیری آنتی بادی IgM در حال حاضر IgM Ab Capture ELISA (MAC- ELISA) می باشد.



شکل ۳. تغییرات تست های آزمایشگاهی در عفونت اولیه و ثانویه با ویروس دنگی در طول مدت یک سال

۴.۱.۴.۳ واکنش متقاطع آزمون های سرولوژیک فلاوی ویروس ها در عفونت با ویروس دنگی

با توجه به تشابه آنتی ژنی اعضای جنس فلاوی ویروس ها با یکدیگر ممکن است در آزمایشات سرولوژیک به علت واکنش متقاطع (Cross Reaction) نتایج مثبت کاذب مشاهده شود. بنابراین نتایج مثبت آنتی بادی های IgG و IgM در یک نمونه بیانگر عفونت قطعی ویروس دنگی نمی باشد و در صورت وجود علائم بالینی تنها می توان موارد مثبت آنتی بادی در یک نمونه تک یا واحد (Single specimen) را به صورت تشخیص محتمل Probable positive گزارش نمود. برای تایید تشخیص این موارد نیاز به ۲ نمونه (Paired specimens) می باشد. نمونه اول در فاز حاد و نمونه دوم در فاز نقاهت و با فاصله حداقل ۱۴ روز از یکدیگر باید تهیه شود. در صورت مشاهده سروکانورژن (تغییر نتیجه سرولوژیک منفی به مثبت) و یا افزایش ۴ برابری میزان آنتی بادی IgG در نمونه دوم نسبت به نمونه اول عفونت ویروس دنگی تایید می شود.

برای تأیید عفونت همچنین می توان از روش های میکرونوترالیزاسیون یا خنثی سازی کاهش پلاک Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) استفاده نمود ولی با توجه به اینکه این روش ها نیازمند کشت ویروس هستند به طور روتین کاربرد ندارند.

۵. الگوریتم تشخیص آزمایشگاهی عفونت ویروس دنگی در ایران

الگوریتم تشخیص آزمایشگاهی عفونت ویروس دنگی در ایران شامل ترکیبی از روش های تشخیصی مستقیم و غیر مستقیم برای شناسایی ژنوم ویروس، آنتی ژن NS1 و آنتی بادی های IgM و IgG می باشد. در این الگوریتم نمونه فاز حاد بیماری که در مرحله ویرمیک (۷ روز اول بیماری) تهیه شده است برای شناسایی ژنوم با روش Real Time RT-PCR، شناسایی آنتی ژن NS1 و شناسایی آنتی بادی های IgM و IgG با روش ELISA و یا روش تشخیص سریع (Immunoassay-based) مورد استفاده قرار می گیرد. در صورتیکه تشخیص قطعی بر اساس نمونه اول حاصل نگردید نمونه دوم (نمونه فاز نقاهت) با فاصله ۱۴ روز از نمونه اول تهیه شده و برای شناسایی آنتی بادی های IgM و IgG با روش ELISA و یا روش تشخیص سریع مورد استفاده قرار می گیرد.

۶. تفسیر نتایج آزمایشگاهی

۶.۱. تشخیص قطعی عفونت حاد ویروس دنگی:

مثبت شدن یا مشاهده هر یک از موارد ذیل می تواند تایید کننده تشخیص قطعی عفونت حاد ویروس دنگی باشد (جدول ۱ و شکل ۴):

- روش های تشخیص مولکولی (Real Time RT-PCR)
- آنتی ژن NS1
- سروکانورژن IgM در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز حاد
- سروکانورژن IgG در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز حاد
- افزایش حداقل ۴ برابری تیتراژ آنتی بادی IgG در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز حاد

۶.۲. تشخیص محتمل Probable Dengue infection

- مثبت شدن IgM در یک نمونه بالینی
- مثبت شدن IgG در یک نمونه بالینی
- مثبت شدن IgM و IgG در یک نمونه بالینی

نکته ۱: نتیجه منفی Real Time RT-PCR یا NS1 عفونت حاد را رد نمی کند و در صورت وجود شک بالینی و تشخیص پزشک برای مشخص کردن وضعیت بیمار نیاز به انجام آزمایش های سرولوژی می باشد.

نکته ۲: در مواردی که علیرغم جمع آوری و آزمایش نمونه در دو مرحله حاد و نقاهت تشخیص قطعی حاصل نمی گردد پس از کنترل کلیه مراحل مربوط به فرآیند قبل از انجام آزمایش، لازم است نتیجه آزمایش به صورت مبهم یا Indeterminable ثبت شده و در این حالت باید با آزمایشگاه مرجع کشوری مشورت شده و برای تشخیص تصمیم گیری شود.

جدول ۱. تفسیر نهایی نتایج آزمایشات تشخیصی بر روی نمونه بیمار

	تستهای آزمایشگاهی					Interpretation
	Sample number	NS1	Real time RT-PCR	IgM	IgG	
Single specimen	S ₁	+	+	+	+	DENV Infection
	S ₁	+	+	+	-	
	S ₁	+	+	-	+	
	S ₁	+	+	-	-	
	S ₁	+	-	-	-	
	S ₁	+	UNK	UNK	UNK	
	S ₁	UNK	+	UNK	UNK	
	S ₁	-	+	-	-	
	S ₁	+	-	+	+	
	S ₁	+	-	+	-	
	S ₁	+	-	-	+	
	S ₁	-	+	+	+	
	S ₁	-	+	+	-	
	S ₁	-	+	-	+	
	S ₁	-	-	+	+	Probable DENV Infection*
	S ₁	-	-	+	-	
	S ₁	-	-	-	+	
	S ₁	-	-	-	-	Negative**
Paired specimens	S ₁	-	-	-	-	DENV Infection
	S ₂	-	-	+	-	
	S ₁	-	-	-	-	DENV Infection
	S ₂	-	-	+	+	
	S ₁	-	-	-	-	DENV Infection
	S ₂	-	-	-	+	
	S ₁	-	-	+	-	DENV Infection
	S ₂	-	-	+	+	
	S ₁	-	-	+	+	DENV Infection
	S ₂	-	-	+	+	
	S ₁	-	-	+	+	Presumptive Past DENV OR other flaviviruses Infection
	S ₂	-	-	+	+	
	S ₁	-	-	+	+	Presumptive Past DENV OR other flaviviruses Infection
	S ₂	-	-	-	+	
	S ₁	-	-	-	-	Negative
	S ₂	-	-	-	-	
	S ₁	-	-	+	+	Indeterminable***
	S ₂	-	-	-/+	-	

DENV : Dengue Virus UNK : Unknown

S₁ : Acute phase Sample S₂ : Convalescent phase Sample

* تشخیص قطعی نیازمند نمونه دوم می باشد

** در صورت وجود شک بالینی نمونه دوم باید درخواست و از نظر آنتی بادی های IgM و IgG تست شود.

*** در این حالت باید با آزمایشگاه مرجع کشوری مشورت شده و برای تشخیص تصمیم گیری شود

بخش دوم : مدیریت و انتقال امن و ایمن نمونه های بالینی

الزامات نمونه گیری :

- تعیین و استفاده از پوشش ها و وسایل حفاظت فردی باید براساس ارزیابی ریسک انجام شود و شامل دستکش (نیتریل یا لاتکس)، روپوش آزمایشگاهی، محافظ صورت (Shield) یا عینک ایمنی یا گاگل (Goggles) می باشد. بدیهی است در صورت شک به تب های خونریزی دهنده ویروسی نظیر CCHF (تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو) می بایست، پوشش و وسایل حفاظت فردی متناسب با ریسک های موجود استفاده شود. در این شرایط علاوه بر موارد فوق، دو لایه دستکش (نیتریل یا لاتکس)، ماسک N95، گان یکسره (Coverall) آزمایشگاهی مقاوم به نفوذ مایعات و در صورت لزوم روکش کفش استفاده شود.
- ترتیب پوشیدن و به خصوص بیرون آوردن (Donning and Doffing) پوشش ها و وسایل حفاظت فردی از اهمیت زیادی برخوردار است.
- از تهیه نمونه در لوله های شیشه ای، لوله های بدون درب، و لوله های حاوی ضد انعقاد هپارین جداً خودداری شود.

جدول ۲. گروه خطر و اقدامات احتیاطی توصیه شده در مورد برخی ویروسهای تب خونریزی دهنده

نام	مخفف	وضعیت تاکسونومی (خانواده- جنس)	سطح ایمنی زیستی پیشنهادی BSL	گروه خطر	فیلتر هپا/ خروجی آزمایشگاه
تب خونریزی دهنده کریمه کنگو	CCHFV	نایروویروس	۴	۴	بله
ویروس دنگی	DENV	فلاوی ویروس	۲	۲	خیر
زیکا	ZIKAV	فلاوی ویروس	۲	۲	خیر
چیکونگونیا	CHIKV	آلفا ویروس	۳	۳	بله

نحوه نمونه گیری وریدی:

قبل از اقدام به نمونه گیری از فراهم بودن ملزومات نمونه گیری شامل سیستم خونگیری خلاء (ونوجکت)، لوله حاوی ژل جدا کننده سرم (SST)^۳، محلول های گندزدای مناسب مانند اتانول ۷۰ درصد و سفید کننده خانگی با رقت ۱:۱۰، ظروف ایمن Safety box جهت دفع پسماند های تیز و برنده و مائیک ضد آب جهت درج مشخصات بیمار بر روی لوله اطمینان حاصل شود.

³ Serum Separating Tube (SST)

با استفاده از سیستم خونگیری خلاء (ونوجکت)، ۸ تا ۱۰ میلی لیتر خون وریدی در لوله های حاوی ژل جدا کننده سرم تهیه شود. مزیت این لوله ها این است که پس از جداسازی سرم توسط سانتریفیوژ، ژل داخل لوله بین سلول های خونی و سرم قرار می گیرد و بنابراین نیازی به انتقال سرم به لوله های دیگر نمی باشد. بنابراین نمونه سرم در همان لوله ای که در زمان خونگیری مورد استفاده قرار گرفته است قابل ارسال می باشد (تصویر ۱).

علیرغم رعایت احتیاطات لازم، ترجیحاً اطراف لوله حاوی نمونه با مواد گندزدای مناسب مانند اتانول ۷۰ درصد، گندزدایی گردد.

با استفاده از ماژیک ضد آب نام کامل بیمار، نوع نمونه، نوبت نمونه گیری و تاریخ نمونه گیری بر روی لوله درج شود. محل اتصال در لوله حاوی نمونه و بدنه با پارافیلیم پوشانده شود.

نکته: در صورت عدم دسترسی به لوله ژل دار نمونه گیری در لوله آزمایش انجام پذیرد و سرم پس از جداسازی به کرایوتیوب منتقل و اطلاعات بر روی کرایو تیوب درج شود.

جداسازی سرم:

بلافاصله پس از خونگیری لوله را حداقل ۵ مرتبه به آرامی به صورت up & down حرکت دهید تا ایجاد لخته تسریع شود.

لوله را در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه قرار دهید تا لخته تشکیل شود.

سانتریفیوژ لوله (طبق پروتکل شرکت سازنده لوله) با رعایت این نکات انجام شود: از سانتریفیوژهایی که باکترهای آنها دارای درپوش است و یا سانتریفیوژهای دارای کاپ درپوش دار استفاده شود. در صورت عدم دسترسی به سانتریفیوژهای مورد اشاره هنگام استفاده از سانتریفیوژ به منظور جدا سازی نمونه باید از پوشش ها و وسایل حفاظت فردی پیش گفت استفاده شود.

نمونه گیری و سانتریفیوژ نمونه باید طبق دستورالعمل شرکت سازنده یا وارد کننده لوله های SST صورت گیرد. در شرایط عدم دسترسی به لوله های SST، می توان از لوله های معمولی برای جداسازی سرم نیز استفاده نمود. در این صورت نمونه سرم زیر هود بیولوژیک کلاس ۲ و با رعایت الزامات ایمنی زیستی جدا شده و در ۳ عدد کرایوتیوب (۲ میلی لیتری) تقسیم شود.



شکل ۴: لوله SST قبل از سانتریفیوژ و بعد از آن. پس از سانتریفیوژ لخته در پایین لوله، سرم در بالا و ژل در بین آن دو قرار خواهد گرفت.

نوع و حجم نمونه:

نمونه ارجح برای انجام آزمون های تشخیصی، سرم و حداقل حجم، ۲ میلی لیتر مورد نیاز است.

نمونه های موارد خاص:

- نمونه پلاسما و یا خون کامل با حداقل حجم ۲ میلی لیتر مورد نیاز است
- نمونه بیوپسی و اتوپسی : قبل از نمونه برداری و ارسال با آزمایشگاه مرجع کشوری هماهنگ گردد.
- نمونه مایع مغزی نخایی (CSF) نمونه مورد نیاز ۱ سی سی از مایع مغزی نخاعی می باشد

دفع پسماند عفونی:

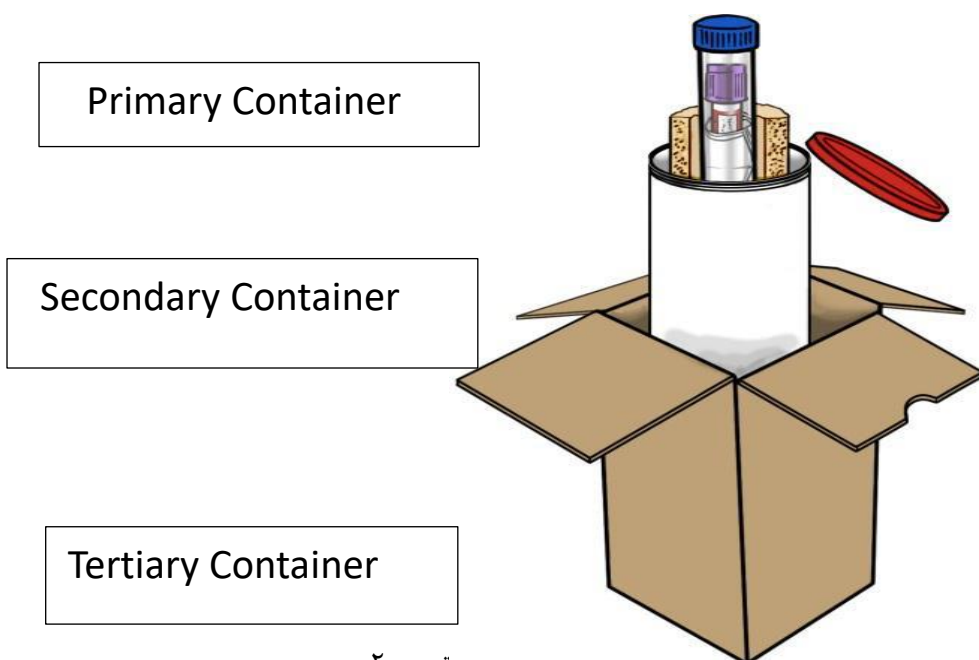
شخص مسئول جمع آوری پسماند باید از پوشش ها و وسایل حفاظت شخصی مناسب استفاده کند. پسماند باید در کیسه های دفع پسماند عفونی زرد رنگ و جدا از دیگر پسماندهای آزمایشگاهی جمع آوری شوند. کیسه نباید بیش از نصف ظرفیت خود پر شود. به میزان ۲۰۰-۳۰۰ میلی لیتر آب به کیسه اضافه شود. لبه کیسه کشیده شود و دور آن را با چسب پهن محکم گردد. تمام سطح خارجی کیسه را با دستمال آغشته به محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱:۱۰ گندزدایی شود (برای جلوگیری از تولید آئروسول محلول اسپری نشود). کیسه در داخل یک کیسه مخصوص اتوکلاو قرار داده شود. تمام سطح خارجی کیسه مخصوص اتوکلاو با دستمال آغشته به محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱:۱۰ گندزدایی گردد. طبق شرایط تعیین شده توسط شرکت تولید کننده یا وارد کننده، به طور مثال اتوکلاو پسماندهای عفونی در ۱۳۴ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، انجام شود. با استفاده از اندیکاتور شیمیایی و بیولوژیک صحت عملکرد اتوکلاو تایید شود. کلیه پسماندهای تیز و برنده باید در ظروف ایمن (Safety Box) و حداکثر تا ۳/۴ حجم ظرف، جمع آوری و قبل از دفع اتوکلاو شده و به طریقه ایمن دفع گردند.

انتقال امن و ایمن نمونه

-باید فرد و یا افراد مسئول انتقال نمونه، آموزش های لازم از جمله شناخت بیماری، رعایت الزامات ایمنی و امنیت زیستی، استفاده از پوشش ها و وسایل حفاظت فردی، نحوه آلودگی زدایی و نیز روش صحیح انتقال نمونه به آزمایشگاه مرجع

کشوری و آزمایشگاه های همکار مرجع، انتقال نمونه در بخش های مختلف بیمارستان و آزمایشگاه را جهت جلوگیری از خطر انتقال بیماری به خود، همکاران، جامعه و محیط زیست را فرا گرفته باشند.

- جهت بسته بندی و انتقال نمونه از راه زمینی، می توان از سیستم بسته بندی سه لایه طبق شرایط تعیین شده با حفظ زنجیره سرد در طول مدت انتقال و یا از محفظه های تجاری ساخت داخل استفاده نمود. در صورت حمل هوایی، استفاده از علایم و برچسب های مختص مواد عفونی گروه B طبق "دستورالعمل روش استاندارد انتقال نمونه های عفونی" ضروری است.



تصویر ۲

روش استاندارد بسته بندی نمونه عبارت است از:

- استفاده از پوشش ها و وسایل حفاظت فردی استاندارد الزامی است.
- ابتدا جهت رفع آلودگی احتمالی، اطراف لوله با محلول اتانول ۷۰ درصد گندزدایی شود.
- محل اتصال در لوله حاوی نمونه و بدنه با پارافیلیم پوشانده شود. باید اطراف لوله حاوی نمونه، مقدار کافی ماده جاذب (مانند اسفنج، چند لایه حوله کاغذی، دستمال جاذب و غیره) قرار گیرد تا در صورت شکستگی یا نشت، ماده جاذب توانایی جذب کل مایعات را داشته باشد.
- هر لوله یا کرایوتیوب های حاوی سرم که نام کامل بیمار، نوع نمونه و تاریخ نمونه گیری بر روی آن ها قید شده است در داخل یک فالکون در پیچ دار مقاوم (که از قبل نام بیمار، نوبت نمونه گیری و تاریخ نمونه گیری توسط مازیک ضد آب بر روی آن ثبت شده است) قرار داده شود.
- جهت حذف آلودگی احتمالی اطراف لوله فالکون با محلول سفید کننده خانگی با رقت ۱:۱۰ گندزدایی شود.
- اطراف در لوله فالکون به طور کامل توسط پارافیلیم پوشانده شود. برای جلوگیری از تماس لوله ها با هم، دور هر لوله به طور جداگانه، با ماده ضربه گیر کافی (مانند اسفنج، حوله کاغذی، دستمال جاذب و غیره) پوشانده شود تا در صورت آسیب به لوله ها، مواد آلوده به بیرون نشت ننماید.

- فالکون حاوی لوله را می توان در داخل محفظه تجاری مخصوص حمل و نقل نمونه های عفونی قرارداد.
- در این محفظه ها، جداکننده ای از جنس اسفنج برای نگهداری لوله های فالکون تعبیه شده است که خاصیت ضربه گیر هم دارد. در زیر آن ژل پک جهت حفظ زنجیره سرما تعبیه گردیده است. مطابق دستورالعمل شرکت سازنده می بایست محفظه ژل پک به مدت زمان کافی در فریزر منفی ۲۰، قرارداده شود. علیرغم توصیه شرکت سازنده، به مدت زمان حفظ زنجیره سرد بر اساس مسافت و شرایط آب و هوایی نیز باید توجه نمود.
- در صورت عدم استفاده از محفظه های تجاری، لایه سوم را کلد باکس تشکیل می دهد. لوله فالکون را در داخل کلد باکس می توان به کمک چند Ice Pack، ثابت نمود.

ارسال نمونه

- نمونه های مربوط به بیماران فرضی، محتمل و قطعی بیماری باید حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از نمونه گیری به آزمایشگاه مرجع کشوری و یا همکار مرجع تحویل گردد.
- توجه:** تمام نمونه های مثبت و ۱۰ درصد نمونه های منفی شناسایی شده توسط آزمایشگاه های همکار مرجع باید جهت تایید و بررسی های اپیدمیولوژی مولکولی و سرولوژی به آزمایشگاه مرجع کشوری آربوویروس ها و تب های خونریزی دهنده ویروسی انستیتو پاستور ایران ارسال گردد.
- ارسال نمونه صرفاً توسط رابطین دانشگاه / دانشکده باید انجام شود. به منظور جلوگیری از بروز هر گونه آلودگی و انتقال صحیح نمونه به آزمایشگاه، از ارسال نمونه توسط پیک موتوری، تاکسی و پست عمومی اکیداً خودداری شود.
- قبل از ارسال نمونه جهت هماهنگی و اطمینان از آمادگی دریافت نمونه، با آزمایشگاه مرجع کشوری و یا همکار مرجع تماس گرفته شود.
- به همراه نمونه، فرم اطلاعات بیمار و نامه درخواست آزمایش به آزمایشگاه ارسال گردد. نامه درخواست باید در پاکت تعبیه شده در قسمت داخلی محفظه بیرونی قرار داده شود. لازم به ذکر است در صورت ارسال نمونه بدون فرم اطلاعات بیمار و نامه درخواست آزمایش، نمونه مورد آزمایش قرار نخواهد گرفت.
- برروی محفظه انتقال نمونه موارد ذیل باید قید گردد:
 - نام، آدرس و شماره تماس فرستنده
 - نام و آدرس کامل گیرنده
- عبارت "مواد بیولوژیک کلاس B" (Biological substance, Category B).
- شرایط دمایی نگهداری نمونه در بیرون جعبه درج شود: یخچال یا فریزر (در صورت نیاز).
- رعایت زنجیره سرد در تمامی مراحل بسته بندی و حمل نمونه به آزمایشگاه الزامی می باشد.
- در صورت آسیب دیدن بسته بندی و یا نشت مواد باید فوراً به مسئولین مربوطه اطلاع داد.
- مسئولیت ارسال کننده نمونه زمانی به پایان می رسد که نمونه عفونی تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل شده و رسید دریافت گردد.

نگهداری نمونه قبل از ارسال

- سعی شود بلافاصله پس از نمونه گیری، نمونه به آزمایشگاه ارسال شود. با این وجود در صورت لزوم می توان نمونه را با توجه به نکات ذیل تا زمان ارسال نگهداری نمود.
- نمونه در لوله های ژل دار پس از سانتریفیوژ باید در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری شود و حداکثر طی مدت ۴۸ ساعت با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه تحویل داده شود. در صورتی که امکان انتقال در این مدت وجود نداشته باشد نمونه سرم زیر هود بیولوژیک کلاس ۲ و با رعایت الزامات ایمنی زیستی جدا شده و در ۳ عدد کرایوتیوب (۲ میلی لیتری) تقسیم شود. کرایوتیوب ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد حداکثر به مدت ۷ روز قابل نگه داری می باشند.
- اگر مدت زمان انتقال نمونه به آزمایشگاه بیشتر از یک هفته به طول انجامید، باید نمونه سرم جداسازی شده در دمای منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود.
- مراحل بسته بندی و ارسال کرایوتیوب ها مشابه لوله SST می باشد.

موارد عدم پذیرش نمونه:

- هرگونه نشت نمونه به بیرون از لوله
- مخدوش بودن مشخصات برچسب نمونه
- عدم همخوانی مشخصات ذکر شده در فرم با مشخصات برچسب و کد نمونه
- حجم نا کافی نمونه
- جمع آوری نمونه در لوله های نامناسب (لوله حاوی ضد انعقاد هپارین)
- استفاده از لوله نامناسب (بدون درپوش ، لوله شیشه ای)
- نگهداری و انتقال در دمای نامناسب
- عدم ارسال نامه ی درخواست دانشگاه/دانشکده جهت انجام تست
- عدم تکمیل و ارسال فرم خطی بصورت اکسل و فرم کاغذی