

تشخیص آزمایشگاهی بیماری سیاه زخم

سیاه زخم بیماری باکتریائی زئونوز حاد می باشد که توسط باسیل گرم مثبت باسیلوس آنتراسیس ایجاد می شود. عامل بیماری می تواند از طریق خراش های پوستی، تماس با ترشحات حیوان بیمار، استنشاق اسپور و مصرف گوشت آلوده به انسان منتقل شود ولی معمولاً بیماری در انسان در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فرآورده های آلوده آنها از قبیل پشم و پوست ایجاد می شود.

از لحاظ باکتریولوژیکی این باکتری باسیل ضخیم، طویل و در ابعاد ۸-۳ میکرومتر در ۵،۱-۱ میکرومتر، چهار گوش و مستطیلی شکل می باشد. در نمونه های بالینی ارگانیسم به شکل دوتائی و یا زنجیره های کوتاه متشکل از سه الی چهار باسیل مشاهده می شوند. این باکتری دارای کپسولی واضح می باشد. باسیلوس آنتراسیس در شرایط آزمایشگاهی تولید اسپور می کند و در خاک سال ها زنده می ماند.

ویرولانس باکتری به دوفاکتور اصلی توکسین (*Tripartite Toxin*) و کپسول *Poly D glutamic acid* نسبت داده شده و هر دو نیز توسط پلاسמיד کد می شوند. توکسین های این باسیل تحت نام سه پروتئین به نام های *Protective Antigen, Leta Factor, Edema factor* ترشح می شوند. بیماری سیاه زخم در انسان به سه شکل جلدی، تنفسی و گوارشی مشاهده می شود. شایعترین شکل بیماری سیاه زخم جلدی می باشد.

سیاه زخم و تشخیص آزمایشگاهی آن

تشخیص آزمایشگاهی سیاه زخم در آزمایشگاه شامل آزمایش مستقیم، کشت و ایزوله نمودن عامل، روش های سرولوژیک و روشهای مولکولی می باشند.

ملاحظات ایمنی و امنیت زیستی:

بر اساس طبقه بندی سازمان جهانی بهداشت باسیلوس آنترا سیس جزو گروه خطر میکروبی ۳ محسوب می گردد و بسیاری از کشورها این باکتری را در این گروه تقسیم بندی می نمایند. لذا هنگام کار در آزمایشگاه با این میکروارگانیسم باید الزامات ایمنی خاص مربوط به این گروه رعایت گردد.

جهت انجام آزمایش دید مستقیم بر روی نمونه بیمار باید کلیه الزامات سطح ۲ ایمنی زیستی رعایت شود. کشت این میکرو ارگانیسم و یا انجام فعالیت هایی که منجر به تولید میزان زیادی از آئروسول می گردد، باید در سطح ۳ ایمنی زیستی انجام و الزامات این سطح رعایت گردد.

امروزه استفاده از باسیلوس آنتراسیس بعنوان عامل بالقوه بیوتروریسم بر اهمیت این باکتری در مسائل بهداشتی افزوده است. بنابر این باید دخیله و نگه داری این میکروارگانیسم در آزمایشگاهها و مراکز با سطوح بالای ایمنی زیستی انجام پذیرد.

همچنین از لحاظ امنیت زیستی نیز باید تمهیدات لازم در این خصوص صورت گیرد بطوری که مکان نگهداری میکروارگانیسم از مقاومت سازه ای مناسبی برخوردار بوده و هم چنین سطح دسترسی به آن محدود و تعیین شده باشد.

با توجه به ریسک بالای انجام آزمایشهای میکروبیشناسی مبتنی بر کشت باسیلوس آنتراسیس، انجام آزمایشهای میکروبیشناسی باید در آزمایشگاههایی انجام شود که دارای امکانات متناسب با سطح ایمنی زیستی این عامل بیماری را باشند.

وسایل حفاظت فردی:

- جهت نمونه برداری و کار با نمونه های مشکوک به بیماری سیاه زخم (باسیلوس آنتراسیس) در آزمایشگاه باید الزامات زیر رعایت گردد.
- وسایل شخصی مانند حلقه و جواهرات، در آورده شده و گوشی تلفن همراه و خودکار فرد همراه او نباشد.
 - در صورتی که در سطح پوست بریدگی، زخم، خراش، آگرم و غیره وجود دارد، بایستی قبل از پوشیدن وسایل حفاظت فردی با پانسمان غیر قابل نفوذ پوشانده شود.
 - ترجیحا برای حفاظت بیشتر از دو جفت دستکش استفاده شود که در این صورت می توان دستکش های بیرونی را در صورت لزوم و یا پیشگیری از انتشار آلودگی تعویض نمود.
 - روپوش آزمایشگاهی و گان باید پوشیده شود. آستین گان باید بلند بوده و ترجیحا سر آستین کشدار داشته باشد. برای جلوگیری از احتمال تماس پوست با مواد آلوده، لبه دستکش دوم روی لبه سر آستین گان قرار گیرد. همچنین می توان جهت اتصال لبه دستکش به گان از چسب پهن استفاده نمود. اگر گان قلاب شستی داشته باشد، نیازی به چسب زدن نمی باشد.
 - ترجیحا شیلد یا حفاظ صورت پوشیده شود.
 - در موارد مشکوک به سیاه زخم تنفسی باید از وسایل حفاظت فردی تکمیلی نظیر ماسک N95 استفاده شود.
 - جهت دفع صحیح پسماندها، از مفاد دستورالعمل مدیریت پسماند استفاده شود.

۱- روشهای آزمایش میکروسکوپی مستقیم

آزمایش میکروسکوپی نمونه های بالینی جهت تشخیص موارد مشکوک بیماری سیاه زخم و در خصوص نمونه های محیطی، جهت مشاهده اسپور باسیلوس آنترا سیس بکار می رود. رنگ آمیزی های متداول مورد استفاده رنگ آمیزی گرم و پلی کروم متیلن بلو* می باشند.

رنگ آمیزی گرم: شکل تیپیک باسیلوس آنتراسیس در زیر میکروسکوپ مشاهده می گردد. در نمونه های بالینی باسیلوس آنتراسیس بصورت باسیل های گرم مثبت، ضخیم، مستقیم شکل، طویل، چهار گوش و اغلب بصورت تکی، دوتائی و یا زنجیرهای کوتاه متشکل از سه الی چهار باسیل دیده می شوند. زنجیره باسیلها با انتهای بریده و متورم شبیه به "چوب با مبو" Bamboo Stick می باشد. در رنگ آمیزی از کلنی های حاصل از محیط کشت بصورت زنجیره های بلند دیده می شوند. (شکل ۱)

رنگ آمیزی پلی کروم متیلن بلو: این رنگ آمیزی به عنوان روش ایده ال جهت مشاهده کپسول باکتری بکار می رود. کپسول باکتری به رنگ صورتی در اطراف باسیل آبی-سیاه دیده می شود.

* Gram Stain - Polychrome Methylene Blue

همچنین رنگ آمیزی گیمسا و لیشمن نیز جهت مشاهده باسیلوس آنتراسیس در مایعات استریل نظیر خون شامل پلور، آسیت و مغزی نخاعی پیشنهاد می گردد.

نمونه های بالینی مورد قبول: سواب از ضایعات پوستی (وزیکول، اسکاروزخم)، خون و سایر مایعات استریل شامل پلور، آسیت و مغزی نخاعی

۲- روشهای کشت نمونه های بالینی

با توجه به ریسک بالای انجام آزمایشهای میکروبیشناسی مبتنی بر کشت باسیلوس آنتراسیس، انجام آزمایشهای میکروبیشناسی باید در آزمایشگاههایی انجام شود که دارای امکانات متناسب با سطح ایمنی زیستی این عامل بیماری را باشند. کشت خون در زمان تظاهرات بیماری یا در ابتدای بیماری قبل از شروع درمان معمولاً مثبت می باشد. آزمایشگاه در صورت رعایت الزامات ایمنی زیستی مرتبط با عامل بیماری می تواند نمونه های مشکوک به سیاه زخم را دریافت نموده، پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی، کشت، ایزوله نمودن عامل و تشخیص احتمالی باسیلوس آنتراسیس را انجام دهد.

نمونه های بالینی مورد قبول:

الف- سیاه زخم جلدی:

مرحله وزیکولی: بصورت آسپتیک وبا استفاده از سواب استریل از مایع وزیکول جمع آوری گردد. احتمال مشاهده باسیل سیاه زخم در مرحله وزیکولی سیاه زخم جلدی بیشتر می باشد.

مرحله اسکار: نمونه اسکار را پس از بلند کردن لبه خارجی اسکار با چرخاندن سواب استریل مرطوب شده در سرم فیزیولوژی یا آب مقطر استریل بمدت ۲-۳ ثانیه برداشت کنید. (سعی کنید اسکارکنده نشود).

ب- سیاه زخم گوارشی:

خون: ۱۰ سی سی خون را طبق پروتکل آزمایشگاه در بطری کشت خون جمع آوری کنید. در صورتی که بیمار آنتی بیوتیک مصرف نکرده باشد، شانس جدا کردن باسیلوس آنتراسیس از کشت خون ۸-۲ روز پس از در معرض قرار گرفتن با باسیلوس آنتراسیس بیشتر می باشد

مدفوع: حدود ۵ گرم از مدفوع بیمار را مستقیماً در ظرف دهان گشاد، تمیز و استریل و غیر قابل نشت جمع آوری کنید.

سواب رکتال: اگر جمع آوری مستقیم مدفوع مقدور نباشد، از نمونه گیری به روش سواب استفاده شود.

ج- سیاه زخم تنفسی:

خون: ۱۰ سی سی خون را طبق پروتکل آزمایشگاه در بطری جمع آوری کشت خون جمع آوری کنید

نمونه های دستگاه تنفسی: بیش از یک سی سی از ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی را در یک ظرف استریل جمع آوری کنید. سیاه زخم تنفسی معمولاً در خلط دیده نمی شود لذا در سیاه زخم تنفسی جهت تشخیص از نمونه ای دیگر از قبیل خون، مایع مغزی نخاعی و سواب بینی می توان استفاده کرد.

نکته: جمع آوری نمونه جهت کشت باید قبل از مصرف آنتی بیوتیک باشد.

در جدول زیر انواع نمونه هایی که جهت آزمایش از لحاظ باسیلوس آنتراسیس از آنها استفاده می شود ذکر شده است

علائم بالینی	نوع نمونه	مقدار	ظرف	تفسیر
سیاه زخم جلدی	مایع وزیکول	۲ عدد سواب	سواب استریل	یک سواب برای اسمیر مستقیم و کشت - سواب دوم برای PCR
	اسکار / زخم	۲ عدد سواب	سواب استریل مرطوب شده با سرم فیزیولوژی یا آب مقطر استریل	یک سواب برای اسمیر مستقیم و کشت - سواب دوم برای PCR
سیاه زخم استنشاقی / تنفسی	خون	۱۰ میلی لیتر	بطریهای کشت خون	
	مایع مغزی نخاعی	۰,۵ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم - کشت - PCR
	سواب بینی	۲ عدد	سواب استریل	اسمیر مستقیم - کشت
سیاه زخم گوارشی	خون	۱۰ میلی لیتر	بطریهای کشت خون	
	سرم	۲ سی سی	لوله در پیچ دار	آزمون های سروولوژی - فاکتور کشنده*
	مایع آسیت	۲ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم - کشت - PCR - فاکتور کشنده
	مایع پریتوان	۲ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم - کشت - PCR - فاکتور کشنده
مننژیت	مایع مغزی نخاعی	۰,۵ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم - کشت - PCR
	خون	۱۰ میلی لیتر	بطریهای کشت خون	
	سرم	۲ سی سی	لوله در پیچ دار	آزمون های سروولوژی - فاکتور کشنده*

*جهت شناسایی فاکتور کشنده نمونه پلاسما ارجحیت دارد

۳- روش های تشخیص مولکولی

روش های مولکولی بسیار حساس و اختصاصی بوده و بر پایه شناسایی ژن های کروموزوم باسیلوس آنتراسیس و ژن های پلاسمید که برای فاکتورهای ویروالانس نظیر کپسول ، آنتی ژن های محافظتی و فاکتور کشنده کد شده اند، استوار می باشد. این روش می تواند تایید کند که ایزوله های جدا شده از کشت ، باسیلوس آنتراسیس است و هم چنین افتراق بین سویه ویروالانت از غیر ویروالانت می باشد.

نمونه های مورد قبول:

سوپا از ضایعات پوستی (وزیکول ، اسکار و زخم) ، خون سوپا رکتال ، مایعات استریل شامل پلور ، آسیت و مغزی نخاعی ، سوسپانسیون کلنی در سرم فیزیولوژی استریل

۴- روش های سرولوژیک

روش های سرولوژیک بیشتر بر پایه تولید آنتی بادی بر علیه توکسین باکتری می باشد. شناسایی آنتی بادی ضد آنتی ژن محافظتی (IgG) با روش الایزا می تواند بعنوان یک شناساگر در فاز حاد پس از مواجهه با باسیلوس انتراسیس باشد. همزمان تاثیر واکسن را همانند حیوانات در انسان نیز تایید می کند. معمولا دو نمونه جهت آزمون های سرولوژی جمع آوری می گردد نمونه اول کمتر از ۷ روز پس از شروع علائم یا تماس مشکوک و نمونه دوم در فاز نقاهت ۳۵-۱۴ روز پس از شروع علائم تهیه شود. پیشنهاد می گردد نمونه دوم دو هفته پس از نمونه اول تهیه شود.

نمونه های مورد قبول:

۱۰ سی سی خون کامل در لوله در پیچ دار تهیه گردد. در صورتی که جدا سازی سرم امکانپذیر نباشد نمونه خون در دمای ۴ درجه حداکثر تا ۲۴ ساعت باید به آزمایشگاه منتقل گردد. در غیر این صورت نمونه خون سانتیفریوژ شده و سرم در منهای ۲۰ درجه تا انتقال نمونه نگه داری گردد.

۵- روش ایمونوفلورسنت

جهت شناسایی آنتی ژن باکتری بر روی نمونه های بافتی می باشد.

۶- روش طیف سنجی جرمی

جهت شناسایی فاکتور کشنده می باشد.

مزایا و معایب تست های مختلف در تشخیص سیاه زخم

نوع نمونه	تست	سرعت (ساعت)	حساسیت	اختصاصیت	تفسیر جهت تشخیص
نمونه های کلینیکی	رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی پلی کروم متیلن بلو	۱ ۱	متغیر متغیر	اختصاصی نیست ٪۱۰۰	مشکوک محتمل

کشت	۱۸-۲۴	بالا	٪۱۰۰	تاییدی
PCR(PA DNA)	۷-۸	بالا	٪۱۰۰	محتمل
ELISA(PA)	۴	متغیر	٪۱۰۰ (جهت نمونه های	محتمل
ELISA(anti PA)	۴	متغیر	تازه)	جهت پی گیری
		پایین	بالا	دوران نقاهت

PA :Protective Antigen

نقل و انتقال نمونه های بالینی مشکوک به بیماری سیاه زخم

انتقال نمونه های آلوده یا نمونه هایی که احتمال آلودگی آنها وجود دارد از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، از بخش های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه بیمارستان یا آزمایشگاه خارج از بیمارستان و نیز از مطب پزشکان به آزمایشگاه، باید تحت شرایط استاندارد صورت گیرد. این روند باید با استفاده از ظروف مناسب، بسته بندی به روش استاندارد با درج علائم و برچسب های لازم روی بسته، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه، و در نظر داشتن شرایط مناسب طی انتقال نمونه به نحوی که کیفیت و تمامیت نمونه حفظ شود، صورت پذیرد.

انتقال نمونه های بیولوژیک و کشت های میکروبی از قوانین بین المللی تبعیت می کند و آزمایشگاهها و سایر مراکز بهداشتی درمانی ملزم به رعایت آنها می باشند. ارسال نمونه های بیولوژیک در گروه B مواد عفونی قرا گرفته و تابع قوانین UN3373 و کشت های میکروبی در گروه A مواد عفونی قرار گرفته و تابع قوانین UN 2814 می باشند. بنابر این بسته بندی استاندارد سه لایه ای، درج علائم و برچسب گذاری باید طبق قوانین مورد اشاره صورت گیرد.

شرایط انتقال و نگه داری نمونه:

- ۱- سواپ ها: انتقال به آزمایشگاه در دمای اتاق صورت گیرد. نمونه هایی که از جمع آوری آنها بیش از یک ساعت گذشته باشد باید در زنجیره سرد و در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل گردند.
- ۲- مدفوع: انتقال نمونه های بدون ماده نگه دارنده در فاصله زمانی یک ساعت در دمای اتاق صورت گیرد. در غیر این صورت نمونه مدفوع در محیطهای انتقالی نظیر کری بلر در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل گردند.
- ۳- خلط: انتقال در ظرف در پیچدار استریل در فاصله زمانی یک ساعت در دمای اتاق صورت گیرد. در غیر این صورت در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل گردد.
- ۴- نمونه هایی از قبیل مایع مغزی نخاعی، بطریهای کشت خون و سایر مایعات استریل بدن باید در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل گردند.

سطح بندی نحوه ارائه خدمات تشخیصی آزمایشگاهی :