

# بخش سوم، ملاحظات آزمایشگاهی

هدف استانداردسازی تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های هانتاویروسی در سطح کشور، تسریع در شناسایی موارد، کاهش خطر انتقال (به‌ویژه برای ویروس آندس) و هماهنگی با نظام مراقبت سندرمیک ایران است. دامنه اجرای آن شامل تمام آزمایشگاه‌های شبکه تشخیص کشور (شهرستانی، استانی، مرجع کشوری) و شرایط ارجاع نمونه به آزمایشگاه مرجع آربوویروس‌ها و تب‌های خونریزی‌دهنده ویروسی انستیتو پاستور ایران می‌باشد.

نمونه‌گیری باید با رعایت احتیاطات استاندارد و تجهیزات حفاظت فردی (دستکش، روپوش و ماسک N95 در صورت مشکوک بودن به ویروس آندس) انجام شود.

### نمونه مناسب و نگهداری نمونه

جهت تشخیص سرولوژیک و مولکولی، تهیه نمونه در فاز حاد بیماری الزامی است. همچنین برای انجام آزمون RT-PCR، نمونه خون کامل در لوله حاوی EDTA ارجحیت دارد، زیرا حساسیت آن نسبت به سرم بیشتر است.

### شرایط نگهداری و ارسال نمونه سرم

نمونه سرم پس از تهیه باید مطابق شرایط زیر نگهداری و ارسال شود:

- نگهداری کوتاه‌مدت (حداکثر تا یک هفته): در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد

- نگهداری طولانی‌مدت: در دمای ۶۰- تا ۸۰- درجه سانتی‌گراد

- ارسال به آزمایشگاه مرجع: با رعایت کامل زنجیره سرد

### نمونه‌گیری در موارد اتوپسی

در موارد فوت بیمار، تهیه نمونه‌های بافتی جهت انجام آزمون‌های PCR و ایمونوهیستوشیمی توصیه می‌شود. در این موارد:

- بافت‌های منجمد باید در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر نگهداری شوند.

- بافت‌های فیکس شده در فرمالین بافر ۱۰ درصد، به‌ویژه بافت ریه، تهیه گردند.

- حجم فرمالین باید حداقل ۱۰ برابر حجم بافت باشد.

- مدت زمان قرارگیری بافت در فرمالین نباید از ۲۴ ساعت بیشتر باشد.

## شرایط نگهداری و ارسال خون کامل

### الف) در صورت ارسال نمونه طی کمتر از ۷۲ ساعت:

– نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود.

– از انجماد خون کامل خودداری گردد.

– نمونه در یخچال اختصاصی مواد عفونی نگهداری شود.

### ب) در صورت تأخیر بیش از ۷۲ ساعت در ارسال:

– توصیه می شود Buffy coat یا پلاسما از نمونه جدا شود.

– نمونه جداشده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردد.

– از چرخه های مکرر انجماد و ذوب (Freeze-Thaw) جلوگیری شود.

**نکته مهم:** نمونه گیری دیر هنگام (پس از روز چهاردهم بیماری) ممکن است منجر به منفی شدن آزمون RT-

PCR شود. بنابراین، در صورت منفی بودن تست مولکولی همراه با تداوم علائم شدید بالینی، انجام آزمون های

سرولوژی الزامی است. جدول شماره ۱ بهترین زمان بندی نمونه گیری و نوع نمونه ترجیحی نشان داده شده است

جدول شماره ۱: زمان بندی نمونه گیری و روش تشخیصی

| روش تشخیصی                            | نوع نمونه ترجیحی       | زمان بهینه نمونه گیری (پس از شروع علائم)                |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------|
| RT-PCR مولکولی                        | خون کامل (EDTA) یا سرم | روزهای ۳ تا ۱۰ (اوج ویرومی روزهای ۵ تا ۷)               |
| شناسایی IgM نمونه فاز حاد (سرولوژی)   | سرم                    | روز ۵ به بعد (تکرار در روزهای ۱۰-۱۴ در صورت منفی اولیه) |
| شناسایی IgG نمونه فاز نقاهت (سرولوژی) | سرم                    | روزهای ۲۱-۲۸ (نمونه دوم نسبت به نمونه حاد روز ۱-۷)      |

## ایمنی زیستی (Biosafety)

رعایت اصول ایمنی زیستی برای پیشگیری از انتقال عفونت به پرسنل آزمایشگاه الزامی است. موارد انتقال آزمایشگاهی هانتاویروس‌های دنیای قدیم از طریق ذرات آئروسل عفونی به اثبات رسیده است. برای ویروس آندس به دلیل قابلیت انتقال انسان به انسان، اقدامات ایمنی تشدید می‌شود.

– کار با سرم بیماران مشکوک در آزمایشگاه‌های تشخیصی، نیازمند حداقل سطح ایمنی زیستی ۲ (BSL-2) به همراه رعایت احتیاطات استاندارد است.

– تمام فرآیندهایی که احتمال تولید آئروسل دارند (مانند سانتریفیوژ، ورتکس، پیت کردن، باز کردن لوله‌ها) باید درون هود ایمنی زیستی کلاس ۲ ترجیحاً نوع B2 انجام شوند.

– انجام کشت ویروس نیازمند آزمایشگاه‌های سطح ۴ می‌باشد. کشت ویروس ممنوع است مگر در آزمایشگاه‌های مجاز با BSL-4.

## گندزدایی:

هانتاویروس‌ها دارای پوشش لیپیدی بوده و نسبت به محلول هیپوکلریت سدیم (آب ژاول با رقت ۱:۱۰ از محلول ۵٪ معادل ۰٫۵٪ کلر فعال)، دترجنت‌ها (مانند SDS 0.1٪، اتانول ۷۰٪) و ضدعفونی‌کننده‌های رایج آزمایشگاهی و بیمارستانی حساس هستند. زمان تماس حداقل ۱۰ دقیقه ضروری است.

## دفع پسماند عفونی:

تمامی پسماندهای تولیدی (از جمله لوله‌ها، نوک سمپلرها و دستکش‌ها) باید در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص زباله عفونی (با لیبل خطر بیولوژیک) به صورت دوگانه (Double-bagged) قرار گیرند و پیش از خروج از محیط آزمایشگاه حتماً اتوکلاو شده (۱۲۱ درجه، ۳۰ دقیقه) یا بر اساس پروتکل‌های معتبر پسماند عفونی دفع/سوزانده شوند. پسماند مایع (نمونه‌های غیرفعال نشده) باید قبل از تخلیه به فاضلاب، اتوکلاو شود.

## حمل و نقل امن و ایمن نمونه

نمونه‌های بالینی حاوی یا مشکوک به هانتاویروس به عنوان مواد عفونی کلاس A تحت شماره UN2814 طبقه‌بندی می‌شوند. انتقال نمونه‌ها مستلزم استفاده از سیستم بسته‌بندی سه گانه است. اجزاء:

– ظرف اولیه نشت‌ناپذیر (لوله نمونه) که در کیسه پلاستیکی قابل سیل قرار گیرد.

– ظرف ثانویه نشت‌ناپذیر و مقاوم (مانند جعبه پلاستیکی با درپوش رزوه‌دار).

- ظرف خارجی سخت (کارتن یا پلاستیک سخت) با برچسب UN2814 و خطر بیولوژیک.

- همراه نمونه باید فرم درخواست آزمایشگاهی، فرم اپیدمیولوژیک تکمیل شده، و برگه ایمنی (Material Safety Data Sheet) قرار داده شود.

### مدیریت نمونه در موارد فوتی

- اخذ مجوز کالبدگشایی از پزشکی قانونی با ذکر خطر بیولوژیک.
- تیم کالبدگشایی باید از ماسک ۹۵N، دستکش دبل، گان ضد آب و محافظ صورت استفاده کنند. تهویه سالن تشریح باید منفی باشد.
- نمونه برداری از ریه، کلیه، کبد و طحال (هر کدام حداقل ۱ سانتی متر مکعب). یک قسمت در فرمالین بافر ۱۰٪ (نسبت حجمی ۱:۱۰) و یک قسمت منجمد در دمای -۷۰ درجه.
- حمل بافت منجمد با یخ خشک و مانند آنچه در قسمت حمل و نقل ایمن نمونه گفته شد صورت پذیرد.
- دمای انتقال: بر حسب نوع نمونه مطابق آنچه در قسمت نمونه گیری گفته شده است رعایت گردد.