



روش نمونه گیری از بیمار مشکوک به هاری:

(تشخیص پیش و پس از مرگ) مطابق دستور عمل های ۱۴۰۴

هاری تقریباً همیشه پس از بروز علائم بالینی کشنده است. و بیوپسی مغزی پس از مرگ همچنان استاندارد طلایی تشخیص قطعی این بیماری محسوب میشود.

این دستورعمل محل دقیق نمونه برداری را برای افزایش دقت تشخیص مشخص می کند، که طبق آخرین پروتکل های سال ۲۰۲۵ برای نمونه برداری و بررسی نمونه بزاق، بیوپسی پوست گردن و بافت مغز در موارد مشکوک به هاری برای تهیه نمونه از محل صحیح ارائه شده است.

الف) نمونه گیری پیش از مرگ:

❖ نمونه بزاق:

از بیمار، با رعایت کامل اصول ایمنی و استفاده از دستکش، به کمک پمپ پاستور پلاستیکی سه نمونه بزاق، هر یک به حجم ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر و در فاصله های زمانی ۳ تا ۶ ساعت جمع آوری شود. نمونه ها باید در ظروف کاملاً دربسته و تمیز (مانند فالکون، لوله آزمایش یا کرایوتیوب)، بدون افزودن هیچ گونه ماده نگهدارنده، قرار داده شده و با رعایت زنجیره سرما به آزمایشگاه منتقل شوند.

توجه: آسپیراسیون تراشه و خلط برای آزمایش هاری مناسب نیست.

❖ بیوپسی پوست گردن:

یک نمونه نسبتاً ضخیم پوست به قطر ۵ تا ۶ میلی متر باید از ناحیه خلفی گردن، در حدفاصل رویش مو، تهیه شود. نمونه بیوپسی پوست باید حداقل شامل ۱۰ فولیکول مو با عمق مناسب باشد، به گونه ای که اء صاب پوستی در قاعده فولیکول ها را دربرگیرد.

بیوپسی های تهیه شده باید بر روی یک قطعه کوچک گاز استریل مرطوب شده با سرم فیزیولوژی قرار داده شوند و سپس درون یک ظرف انتقال کاملاً دربسته گذاشته شوند. این مجموعه باید با رعایت زنجیره سرما ارسال گردد.

توجه: نمونه ها باید در اولین فرصت با حفظ زنجیره سرما ارسال شوند؛ در غیر این صورت،

حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از نمونه گیری به انستیتو پاستور انتقال داده شوند.

ب) نمونه گیری پس از مرگ:

موارد تجویز آزمایش پس از مرگ

• بررسی اپیدمیولوژیک

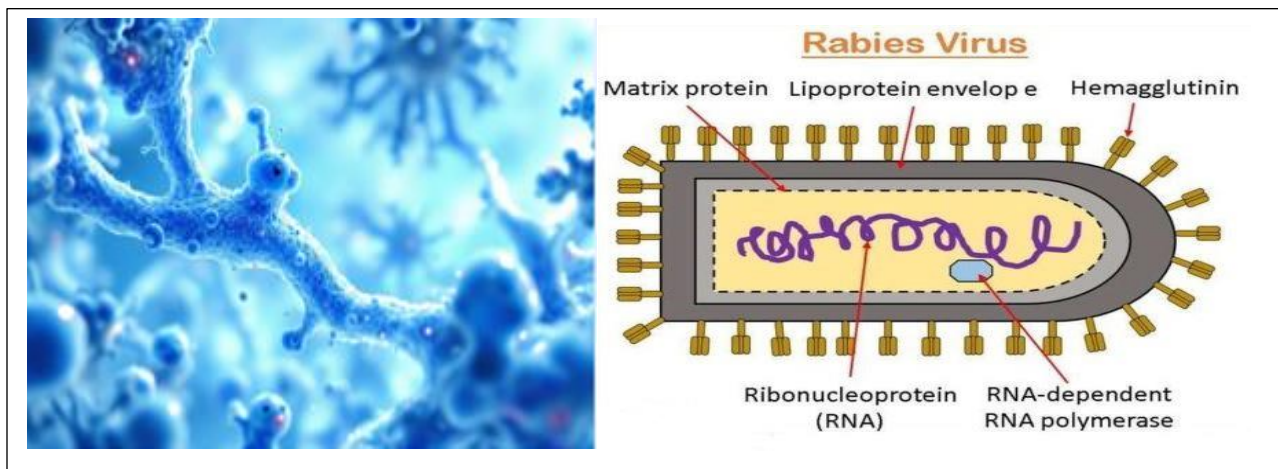
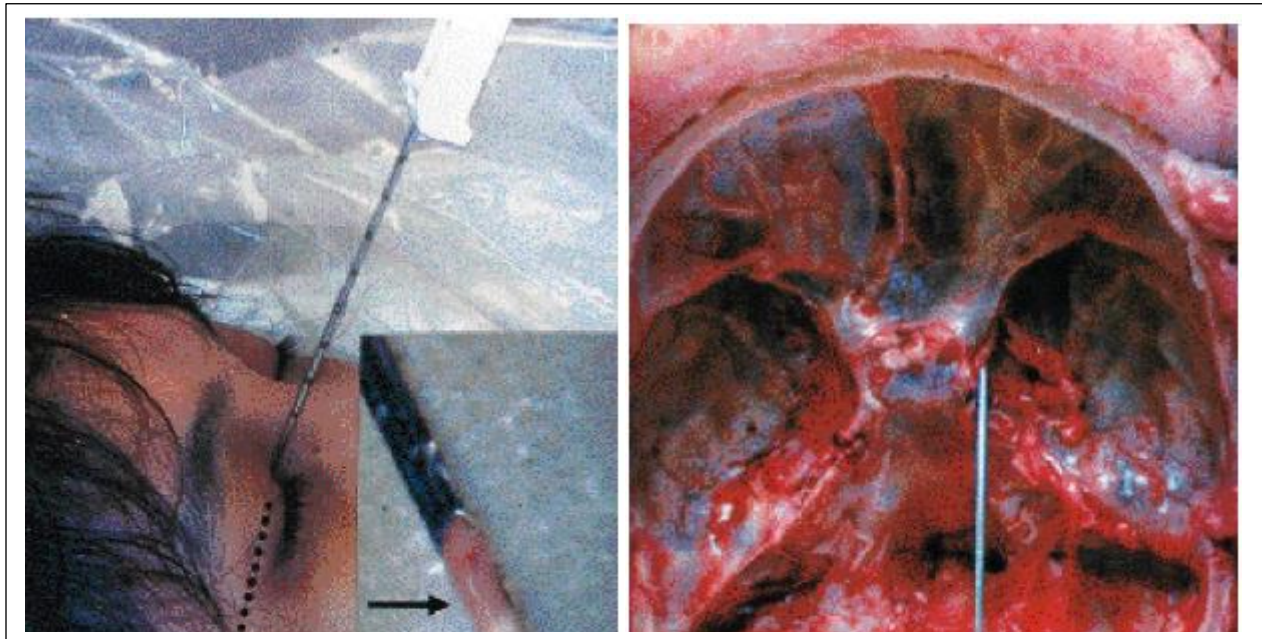
نیاز به بررسی اپیدمیولوژیک و ردیابی موارد هاری به ویژه در رویدادهای اپیدمیک.

- PCR بزاق منفی

در تشخیص پیش از مرگ PCR بزاق منفی باشد یا جواب هنوز حاضر نباشد ولی شک بالینی بالا وجود داشته باشد.

- آنسفالیت با علت نامشخص

بیمار با آنسفالیت با علت نامشخص، علائم عصبی، سابقه تماس یا گزش حیوان (با یا بدون واکسیناسیون) فوت کرده باشد.



روشهای شناسایی ویروس هاری در بافت مغز

- بافت شناسی اجسام نگری

یافته کلاسیک، یافته های ائوزینوفیلیک داخل سیتوپلاسم نورون ها. محدودیت حساسیت حدود ۷۰ درصد در برخی سویه ها دیده نمی شود

- تستهای سریع ایمنوکروماتوگرافیک

قابل استفاده در محیط های کم منبع.

حساسیت کمتر از dFAT دارد اما برای غربالگری مفید است.

• **تست آنتی بادی فلورسانس مستقیم (dFAT)** استاندارد طلایی

روش: اتصال آنتی بادی های نشاندار به آنتی ژن ویروس هاری

زمان پاسخ: ۱ تا ۴ ساعت

دقت: بالای ۹۹ درصد در صورت نمونه گیری صحیح و ارسال استاندارد و صحیح

• **تکنیک مولکولی (RT-PCR)**

شناسایی RNA ویروسی

مناسب برای نمونه های فاسد یا تجزیه شده، به صورت مکمل با dFAT استفاده می شود



پروتکل گام به گام بیوپسی مغز (پس از مرگ)

انجام بیوپسی بر روی بیمار فوت شده به علت هاری نیازمند رعایت دقیق اصول کنترل عفونت است، زیرا ویروس هاری در برخی بافت ها (به ویژه بافت مغز و اعصاب) بسته به دما، رطوبت و شرایط نگهداری تا چند روز زنده می ماند. طبق دستورالعمل کشوری هاری، افرادی که با ویروس هاری یا نمونه های مشکوک به آن سر و کار دارند، باید واکسیناسیون پیش از مواجهه به صورت سالانه دریافت کنند.

خطر اصلی، تماس با غشاهای مخاطی، پوست آسیب دیده یا استنشاق ذرات آلوده به ویروس است. موارد زیر را باید مد نظر داشت:

• **تجهیزات حفاظت فردی (PPE)**

- استفاده از دو لایه دستکش (ترجیحا نیتریل یا لاتکس) با لبه بلند.
- گان یا لباس محافظ ضد نفوذ.
- شیلد صورت یا عینک محافظ برای جلوگیری از پاشش مایعات به چشم.
- ماسک N95 یا بالاتر برای پیشگیری از استنشاق ذرات آلوده هنگام کار با بافت مغز.
- کاور کفش ضدآب یا بوت در شرایط سردخانه یا آزمایشگاه.

• **آگاهی از خطر**

○ ویروس هاری در غلظت های بالا در مغز، نخاع، غدد بزاقی و بافت عصبی وجود دارد.

○ ویروس به طور معمول هماتوژنوز (hematogenous) نیست ولی میتواند از طریق تماس مستقیم با بافت عصبی یا بزاق آلوده منتقل شود.

○ خطر آلودگی تا چند روز پس از مرگ در صورت نگهداری در یخچال وجود دارد و در حالت انجماد طولانی تر باقی می ماند.

محل کار و ابزار

❖ انجام بیوپسی در آزمایشگاه با ایمنی زیستی سطح ۲ (BSL-2) و استفاده از اقدامات سطح ۳ (BSL-3) در صورت دستکاری بافت مغز.

❖ در صورت امکان استفاده از ابزار یک بار مصرف، ابزارهای چندبار مصرف باید بلافاصله اتوکلاو شوند.

❖ از ابزار برقی یا اهره های مولد آئروسول پرهیز شود، در صورت اجبار، در کابین ایمنی زیستی تایید شده یا با سیستم تهویه موضعی انجام شود.

تجهیزات مورد نیاز جهت نمونه برداری مغز برای بررسی ویروس هاری

❖ ماشین مو تراشی: جهت تراشیدن موهای ناحیه جمجمه و آماده سازی محل نمونه برداری

❖ چاقوی اسکالپل: برای ایجاد برش های دقیق در پوست و بافت های سطحی

❖ پنس: جهت نگهداشتن و جابجایی بافت ها بدون آسیب

❖ سوزن بیوپسی: برای برداشت نمونه های بافتی از نواحی خاص مغز

❖ سوزن مخصوص نمونه برداری مغز: با طراحی مناسب برای نفوذ به ناحیه ساقه مغز و برداشت نمونه با حداقل آسیب

❖ نی پلاستیکی: جهت برداشت یا انتقال نمونه به ظرف نگهداری بدون تماس مستقیم با دست یا ابزار فلزی

نکته: این تجهیزات باید استریل، استاندارد و مناسب برای کار بافت عصبی باشند تا از آلودگی، تخریب نمونه یا انتقال بیماری جلوگیری شود.

روش انجام بیوپسی

❖ نمونه مناسب، بافت مغز از هیپوکامپ، ساقه مغز و مخچه برای تشخیص پس از مرگ.

❖ زمان و میزان دستکاری بافت را به حداقل برسانید.

❖ در صورت محدودیت، بیوپسی سوزنی از طریق فورامن ماگنوم (Foramen Magnum)

❖ در حالت ایده آل، کالبد شکافی کامل و برداشت ساقه مغز به علاوه مخچه.

❖ هنگام نمونه برداری از بافت مغز جهت بررسی ویروس هاری، باید از وارد شدن هرگونه آسیب مکانیکی مانند له شدگی به نمونه ها جلوگیری شود. نمونه ها باید با دقت و ظرافت تهیه شوند تا ساختار سلولی آن حفظ گردد.

❖ توصیه می شود نمونه از ناحیه ی ساقه مغز تهیه شود، چرا که این ناحیه از نظر تشخیص ویروس هاری حساسیت بالاتری دارد.

❖ اندازه ی هر قطعه نمونه باید به صورت برش هایی با قطر حدود ۴ میلی متر و حجم تقریبی ۲ میلی متر مکعب باشد.

❖ پس از تهیه، نمونه ها باید در یکی از شرایط زیر نگهداری و ارسال شوند:

○ درون گاز استریل آغشته به نرمال سالین قرار داده شده در ظرف ضد نشت

○ کیت های ارسال نمونه حاوی محلول گلیسرول ۵۰٪ در بافر فسفات سالین (PBS) با pH برابر با ۷/۶

❖ استفاده از مواد تثبیت کننده مانند فرمالین یا الکل ممنوع است، زیرا موجب تخریب آنتی ژن و ژنوم ویروس، اختلال در نتایج آزمایش های ایمونوفلورسانس و مهار کننده PCR می باشد.

❖ به نمونه های مغزی نباید هیچگونه مواد نگهدارنده (Preservative) اضافه گردد.

❖ برچسب واضح با عنوان "مشکوک به هاری - خطر زیستی" الصاق شود.
برای تهیه نمونه مغزی مناسب جهت انجام آزمایش‌های تشخیصی مانند dFAT می‌توان از روش‌های زیر استفاده کرد:

۱- بیوپسی از ناحیه Retro-orbital

- بیوپسی از ناحیه پشت چشم (retro-orbital) با استفاده از سوزن بیوپسی Tru-cut
- این روش امکان دسترسی به نواحی خاص مغز را با حداقل تهاجم فراهم می‌سازد
- نیازمند مهارت بالا و رعایت کامل اصول استریلیته

۲- نمونه برداری از مسیر اکسیپیتال

- از ناحیه پس سری (Occipital) برای دسترسی به ساقه مغز
- استفاده از سوزن‌های مخصوص Lumbar Puncture برای برداشت نمونه بافتی
- این روش در حیوانات یا اجساد انسان کاربرد دارد و باید با دقت بالا انجام شود

ضد عفونی

- ❖ **سطوح:** تمیز کردن با هیپوکلریت سدیم ۰٫۱ درصد (۱۰۰۰ ppm کلر فعال) یا اتانول ۷۰ درصد با زمان تماس حداقل ۳۰ دقیقه.
- ❖ **ابزار:** اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت حداقل یک ساعت یا سوزاندن ابزار یک بار مصرف.
- ❖ **تجهیزات حفاظت فردی (PPE):** با احتیاط خارج شود تا آلودگی به پوست یا لباس منتقل نشود، سپس به عنوان پسماند عفونی دفع شود.

انتقال نمونه ها

- ❖ استفاده از بسته بندی سه لایه مطابق با مقررات UN3373 (Biological Substance, Category B) برای مواد عفونی.
- ❖ حفظ زنجیره سرما (۲ تا ۸ درجه سانتی گراد) برای انتقال کوتاه مدت، انجماد در ۲۰- درجه یا کمتر برای نگهداری طولانی مدت (مگر اینکه آزمایش نیاز به نمونه تازه داشته باشد).
- ❖ ذکر صریح مشکوک بودن به هاری در مدارک ارسالی - طبق راهنمای WHO/IATA برای مواد عفونی (بسته بندی سه لایه و برچسب گذاری)

اقدامات پس از تماس احتمالی

- ❖ در صورت هرگونه تماس بدون حفاظت با بافت عصبی یا بزاق آلوده، یا آسیب با اجسام نوک تیز؛ بلافاصله ناحیه را با آب و صابون به مدت حداقل ۲۰ دقیقه شستشو دهید.
- ❖ موضوع را به واحد بهداشت شغلی اطلاع دهید.
- ❖ پیشگیری پس از تماس (PEP (Post-Exposure Prophylaxis با هاری را فوراً آغاز کنید.

چالش ها و نکات کلیدی

- مسائل اخلاقی و حقوقی

اخذ رضایت آگاهانه قبل از نمونه برداری .

- هاری غیر کلاسیک

برخی سویه ها (مثلا هاری خفاش) ممکن است اجسام نگری-(Negri bodies) نداشته باشند.

- نمونه های فاسد

PCR حساس تر از dFAT است.

نکات کلیدی

- ساقه مغز و مخچه بهترین محل نمونه برداری هستند.
- dFAT سریع ترین و دقیق ترین روش تشخیص است.
- PCR برای نمونه های فاسد ارزشمند است.
- رعایت حداکثری نکات ایمنی الزامی است.

الزامات برچسب گذاری و اطلاعات همراه نمونه مشکوک به هاری

در هنگام ارسال نمونه های انسانی مشکوک به هاری، رعایت موارد زیر الزامی است:

۱. برچسب گذاری دقیق روی ظرف نمونه شامل:

- عبارت: "مشکوک به هاری - خطر زیستی" به صورت خوانا و برجسته
- آدرس کامل فرستنده (نام دانشگاه - استان - شهر - کد پستی)
- آدرس کامل گیرنده (آزمایشگاه مرجع یا مرکز تشخیص)
- شماره تماس ثابت و همراه فرستنده جهت پیگیری و هماهنگی (شماره کارشناس بیماریهای دانشگاه)

۲. اطلاعات همراه نمونه:

- باید در فرم جداگانه ای درج و داخل بسته قرار داده شود، شامل:
 - مشخصات فرد مشکوک (نام، سن، جنسیت، تاریخ مواجهه با حیوان)
 - تاریخچه بیمار
 - تاریخ و ساعت نمونه برداری
 - نوع نمونه و روش نگهداری
 - نام و امضای مسئول نمونه برداری
- حتما قبل از ارسال، اطلاعات و تاریخچه بیمار به مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت اطلاع داده شود.