

تهیه نمونه و جابجایی آن:

موازين دستورالعمل كنترل عفونت را هنگام تهيه نمونه بايد بدرستي رعايت نمود. بر اساس اطلاعات موجود بيشترين تير و ويروس در نمونه هاي ترشحات تنفسي تحتاني (خلط، آسپيره ترشحات ناي، شستشوي ترشحات برونش) بدست مي آيد. ترشحات فوقاني دستگاه تنفس نيز توصيه مي شوند علي الخصوص هنگامي كه امكان تهيه نمونه از ترشحات تحتاني وجود نداشته باشد. در صورت شك به اين بيماري بايد دو نمونه سرم نيز از بيمار تهيه شود و تا زماني كه امكان انجام آزمايشات سرولوژيك فراهم شود نگه داري گردد (اين دو نمونه بايد به فاصله حداقل ۳ هفته از همدگر تهيه شده باشند و نمونه اول در هفته اول بيماري تهيه مي گردد).

نمونه هايي كه براي بررسي از نظر وجود كوروننا و ويروس به آزمايشگاه ديگري ارسال مي شوند بايد در ابتدا از نظر وجود ساير ميكروارگانيسم ها بررسي شود.

در جدول ۱ نام نمونه هايي كه مي توان از بيمار مشكوك تهيه نمود و اقدامات مورد نياز براي ذخيره سازي و انتقال آنها ذكر شده است.

نمونه ها بايد در اسرع وقت به آزمايشگاه رسانده شود (ترجيحا در عرض ۲۴ ساعت). وقتي احتمال مي رود در ساندن نمونه ترشحات تنفسي يا سرم بيمار به آزمايشگاه تاخير ايجاد شود، توصيه مي شود نمونه ها را بر روي يخ خشك بصورت فريز نگهداري نمود.

نوع نمونه	محيط انتقال	انتقال به آزمايشگاه	گروه بندي از نظر خطر انتقال نمونه عفوني	توضيحات
خلط (خلطي كه بطور طبيعي ايجاد شده و تهيه گردد); جمع آوري خلط القا شده مي تواند باعث آلوده شدن كادر درمانی مسئول گردد.	نياز نيست	در درجه حرارت ۲ الي ۸ درجه ساني گراد نگهداري شود (سرمای يخچال). اگر بيش از ۲۴ ساعت تاخير در ارسال وجود دارد بر روي يخ خشك فريز گردد	مواد بيولوژيك، گروه B	مطمئن شويد كه نمونه از ترشحات تحتاني تنفسي تهيه شده است
ترشحات برونشها و كيسه هاي هوايي (Bronchoalveolar lavage)	نياز نيست	در درجه حرارت ۲ الي ۸ درجه ساني گراد نگهداري شود (سرمای يخچال). اگر بيش از ۲۴ ساعت تاخير در ارسال وجود دارد بر روي يخ خشك فريز گردد	مواد بيولوژيك، گروه B	هرچند ممكن است نمونه تا حدی رقيق شده باشد اما كماكان بهترين نمونه است
ترشحات ناي (Tracheal aspirate)	نياز نيست	در درجه حرارت ۲ الي ۸ درجه ساني گراد نگهداري شود (سرمای يخچال). اگر بيش از ۲۴ ساعت تاخير در ارسال وجود دارد بر روي يخ خشك فريز گردد	مواد بيولوژيك، گروه B	
ترشحات حلق و بيني (Nasopharyngeal aspirate)	نياز نيست	در درجه حرارت ۲ الي ۸ درجه ساني گراد نگهداري شود (سرمای يخچال).	مواد بيولوژيك، گروه B	

		اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد بر روی یخ خشک فریز گردد		
سواب ترکیبی گلو و بینی (Combined nose/throat)	محیط انتقال ویروس نیاز است	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری و منتقل شود (سرما یخچال).	مواد بیولوژیک، گروه B	از این نوع نمونه گیری ویروس را جدا نموده اند
سواب حلق و بینی (Nasopharyngeal swab)	محیط انتقال ویروس نیاز است	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری و منتقل شود (سرما یخچال).	مواد بیولوژیک، گروه B	
بیوپسی یا اتوپسی بافتی شامل بافت ریه	محیط انتقال ویروس یا محیط سالین نیاز است	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرما یخچال). اگر بیش از ۲۴ ساعت تاخیر در ارسال وجود دارد بر روی یخ خشک فریز گردد	مواد بیولوژیک، گروه B	
نمونه سرم برای سروژی یا تعیین ویروس (در صورت امکان همیشه دو نمونه سرم تهیه شود؛ یکی در فاز حاد در هفته اول و یکی در فاز نقاهت که ترجیحاً ۳ تا ۴ هفته بعد می باشد)	نیاز نیست	نیاز به یخ یا فریز نمودن نیست.	مواد بیولوژیک، گروه B	
خون کامل	ضد انعقاد EDTA	در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود (سرما یخچال).	مواد بیولوژیک، گروه B	برای تعیین ویروس مخصوصاً در هفته اول بکار می رود

- جابجا نمودن نمونه های ویروسی در محدوده مرزهای هر کشور مطابق با قوانین آن کشور خواهد بود. حمل و نقل نمونه های ویروس دارای کوروناویروس شامل قوانین بین المللی حمل و نقل مواد عفونتزا (۲۰۱۱-۲۰۱۲) است.

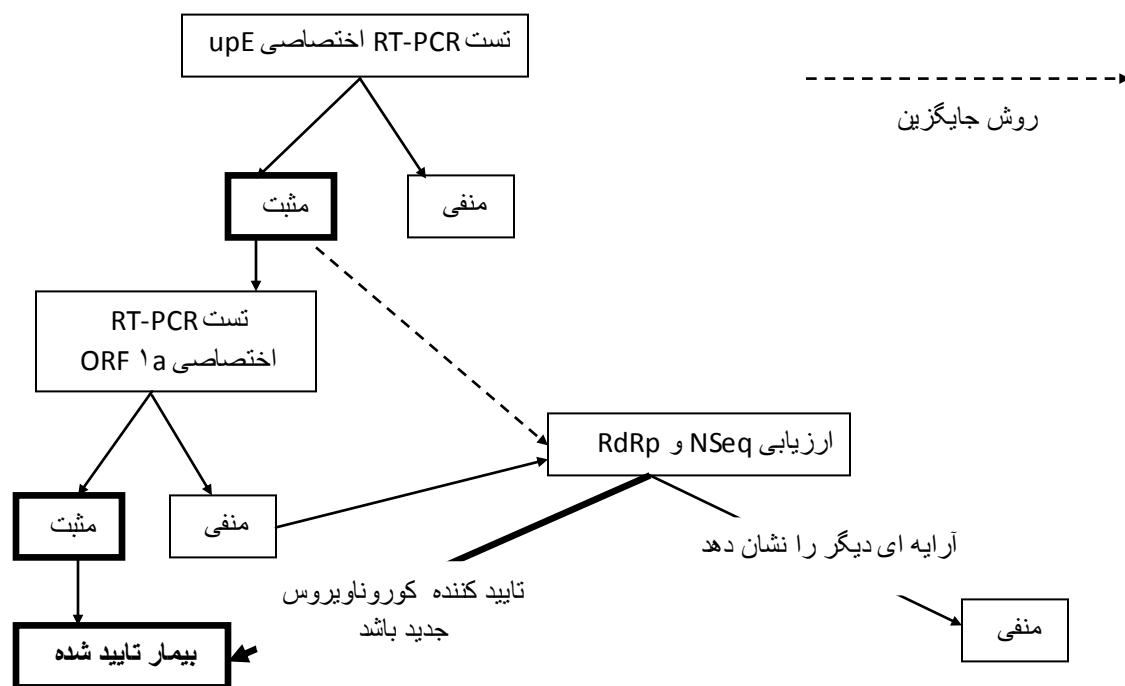
روش تایید معمول کوروناویروس جدید (MERS-CoV) بر اساس تعیین آرایه ژنتیکی منحصربفرد ویروس توسط real-time RT-PCR است. در برخی موارد اگر آزمایشگاه مناسب دارای تجربه کافی و امکانات لازم جهت حفظ نمونه در برابر آلودگی محیط وجود داشته باشد می توان ویروس MERS-CoV را در محیط کشت سلولی کشت داد. دستورالعمل حاضر درمورد روشهای جداسازی ویروس نمی باشد.

هرگونه تست برای تعیین حضور این ویروس در نمونه های تهیه شده باید در آزمایشگاه مجهزی صورت گیرد که نیروی انسانی آموزش دیده در رابطه با تکنیک های مورد استفاده و ایمنی زیستی داشته باشد.

تعدادی روش برای تعیین آرایه ژنتیکی کوروناویروس جدید کشف و منتشر شده است. تست هایی که در حال حاضر استفاده می شوند ژن های upE ، ORF ۱B و ORF ۱a را مورد شناسایی قرار می دهند. تعیین آرایه ژنتیکی مربوط به هدف upE بسیار حساس است و تعیین ORF ۱a نیز به همان میزان حساس است. حساسیت تعیین ORF ۱b نسبت به هدف ORF ۱a حساسیت کمتری دارد اما از ویژگی بالاتری برخوردار می باشد.

بعلاوه، محل های هدف متعددی بر روی ژنوم کوروناویروس MERS-CoV برای شناسایی و تایید تشخیص معرفی شده اند که در ژن های RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) و NSeq (nucleocapsid protein) وجود دارند. اطلاعات بیشتر در مورد این روشها در سایت انستیتو ویروس شناسی Bonn آلمان وجود دارد.

الگوریتم ذیل تست های مورد استفاده جهت بررسی بیماران را نشان می دهد.



وقتی با دو روش که آرایه اختصاصی را بر روی ژنوم کوروناویروس جدید (MERS-CoV) بررسی می نمایند دو نتیجه **ناهماهنگ** بدست بیاید، می توان از ارزیابی آرایه ژنتیکی در قطعات دیگری از RNA ویروس، توسط روش PCR مناسب جهت تایید نتایج آزمایشات قبلی استفاده نمود.

هرچند روش هایی برای ارزیابی سرولوژیک بیان شده اند اما هنوز استفاده گسترده نیافته اند و هرگاه بتوان در سطح وسیع از آنها استفاده نمود، در دستورالعمل های آینده توصیه های لازم در مورد بهره گیری از روشهای سرولوژیک در تشخیص کوروناویروس MERS-CoV منتشر خواهد شد. روشی که فعلا استفاده می شود ارزیابی ایمونوفلورسنس (IFA) به روش معمول (۲۴ ساعته) و یا سریع (۳ ساعته) است. از روشهای سرولوژیک بعنوان روشهای تاییدی در افراد دارای ارتباط اپیدمیولوژیک با بیمار (افراد خانوار یا همکاران تماس یافته با بیمار) استفاده می شود. در تجربه بیماری سارس نشان داده شد که شواهد سرولوژیک بعد از ۱۰ روز پس از شروع بیماری بروز پیدا می کنند و تایید وجود RNA ویروس در ترشحات تنفسی بیماران با تست RT-PCR پس از ۱۵ روز تقریباً ناممکن می گردد. از آنجا که احتمال واکنش متقاطع وجود دارد استفاده از وسترن بلات نیاز به تعداد بیماران بیشتری دارد تا بتوان تست مناسب را معرفی نمود.

لازم به ذکر است در بیماران علامتدار تنها به صرف وجود مجموعه ای از چند جواب منفی نمی توان تشخیص را رد نمود. دلایلی که می تواند باعث وجود **جواب منفی کاذب** گردد عبارتند از:

– کیفیت پائین نمونه تهیه شده، مانند آلوده شدن نمونه ترشحات تنفسی با مواد موجود در حفره دهانی-حلقی

- نمونه در مراحل خیلی زود یا خیلی دیر در سیر بیماری تهیه شده باشد
- حمل و نقل و نگهداری نمونه بدرستی انجام نشده باشد
- دلایل تکنیکی منجر به منفی شدن نمونه

هرگاه نمای کلینیکی بیماری و جوانب اپیدمیولوژیک بیماری مطرح کننده عفونت با کوروناویروس جدید (MERS-CoV) باشد اما نتایج PCR منفی گزارش شود می توان از روشهای سرولوژیک برای تایید تشخیص استفاده نمود و اهمیت تهیه "دو نمونه" جهت بررسی سرولوژیک در اینجا نمایان می گردد.

تفسیر نتایج آزمایشات:

برای اینکه بتوان بیماری را **مورد تایید شده** نامید باید یکی از شرایط ذیل محقق شده باشد:

- آزمایش PCR برای حداقل دو آرایه اختصاصی ژنتیکی متفاوت مثبت شده باشد؛ یا
- آزمایش PCR برای یک آرایه اختصاصی ویروس MERS-CoV مثبت شده باشد و یک آرایه متفاوت دیگر که نشانگر کوروناویروس جدید باشد نیز مثبت گردد.

مثبت شدن تنها یک آرایه اختصاصی برای کوروناویروس MERS-CoV، تایید کننده تشخیص نهایی نیست بلکه برای تعریف "مورد محتمل" یک معیار محسوب می شود. سایر معیارهای کلینیکی و اپیدمیولوژیک در مبحث "تعاریف موارد بیماری" آورده شده است.

قبل از تهیه و ارسال نمونه باید مطمئن بود که بر اساس تعاریف ارائه شده بیمار مورد نظر مورد "مشکوک کوروناویروس MERS" می باشد.

نمونه های مورد نظر و اولویت های نمونه گیری:

برای افزایش احتمال تشخیص عفونت توصیه می شود نمونه های متعدد از محل های مختلف عفونی شده تهیه گردد. برای مثال یک نمونه از دستگاه تنفسی فوقانی توسط سواب بینی حلقی (Nasopharyngeal) و یک نمونه از ترشحات دستگاه تنفس تحتانی (به عنوان مثال نمونه خلط) تهیه شود. تا جاییکه امکان دارد نمونه ها در زمان های مختلف تهیه شوند.

نمونه ترشحات تنفسی تحتانی و مدفوع برای جمع آوری از بیمار ارجح هستند.

برای انتقال در مدت زمان کوتاه باید نمونه تهیه شده را در درجه حرارت ۲ الی ۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری و به سریعترین زمان (در عرض ۲۴ الی ۷۲ ساعت؛ ترجیحاً ۲۴ ساعت) منتقل نمود. اگر در ارسال نمونه ممکن است تاخیری ایجاد گردد پس از تهیه نمونه، آنرا در اولین فرصت در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد نمائید (با توجه به موارد استثناء که در ادامه بیان خواهند شد).

بر روی هر نمونه تهیه شده از بیمار باید تاریخ تهیه نمونه، نوع نمونه تهیه شده و کد مشخصه بیمار ذکر شوند.

۱. جمع آوری نمونه از دستگاه تنفسی بیمار

۱. دستگاه تنفسی تحتانی:

- مایع پلور، آسپیره ترشحات نای، شستشوی آلئول و کیسه های هوایی (Bronchoalveolar lavage)

در یک ظرف غیرقابل نشسته استریل، دارای درب پیچ شونده مخصوص جمع آوری خلط، ۲ الی ۳ سی سی از این مایعات را بریزید. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

- خلط

از بیمار بخواهید تا مقداری آب را در دهان غرغره نماید و سپس با یک سرفه قوی و عمیق ترشحات خلط عمقی خود را از گلو مستقیماً به درون ظرف استریل و غیرقابل نشسته (دارای درب پیچدار) بریزد. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

II. دستگاه تنفس تحتانی

- سواب دهانی حلقی (Oropharyngeal) و بینی حلقی (Nasopharyngeal):

تنها از سواب های با الیاف مصنوعی و دسته پلاستیکی استفاده شود. از سواب های دارای آلژینات کلسیم و سواب های دارای دسته چوبی استفاده نگردد چرا که دارای موادی هستند که ویروس ها غیرفعال نموده و باعث مهار آزمایش PCR می شوند. سواب ها بلافاصله در لوله استریل دارای ۲ الی ۳ سی سی ماده انتقال ویروس (VTM- viral transport media) قرار داده شوند. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

- سواب بینی حلقی (نازوفارنژیال): سواب را بطور موازی با استخوان کام وارد بینی نموده و چند ثانیه در محل نگاه دارید تا ترشحات را جذب نماید. از هر دو حفره بینی باید نمونه تهیه شود.
- سواب دهانی حلقی (اوروفارنژیال): بدون برخورد سواب با زبان و لوزه ها، از ته حلق نمونه تهیه گردد.

- ترشحات بینی:

در این روش ۲ الی ۳ سی سی از ترشحات بینی، در ظرف استریل و غیر قابل نشسته دارای درب پیچدار مخصوص نمونه خلط، ریخته می شود. نمونه در سرمای یخچال نگهداری و منتقل گردد و اگر بیش از ۷۲ ساعت (ترجیحاً ۲۴ ساعت) در ارسال نمونه تاخیر وجود دارد باید نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد نمود.

۲. خون:

- سرم:

برای آزمایش آنتی بادی های سرم لازم می شود نمونه سرم بیمار تهیه گردد. بهتر است نمونه سرم در مرحله حاد بیماری، ترجیحاً در هفته اول تهیه شود و نمونه بعدی با فاصله حداقل ۳ هفته و در مرحله نقاهت تهیه گردد.

کودکان و بالغین - حدود ۵ تا ۱۰ سی سی خون کامل را در لوله ریخته و اجازه می دهند تا لخته شود، سانتریفیوژ مختصر نموده و نمونه سرم را در لوله استریل جمع آوری کننده سرم می ریزند. حداقل نمونه سرم که برای آزمایش لازم می شود ۲۰۰ میکرولیتر است. نمونه سرم در سرمای یخچال نگهداری و منتقل می شود. منجمد نمودن و جابجایی نمونه منجمد نیز قابل انجام است.

شیرخواران - برای انجام آزمایش در شیرخواران حداقل یک سی سی نمونه خون کامل لازم است تهیه شود.

- **پلاسما (خون EDTA):**

مقدار ۱۰ سی سی خون را در لوله آغشته به هپارین (درب سبز) یا لوله دارای EDTA (درب قرمز) بریزید. برای نگهداری و انتقال نمونه از سرمای یخچال استفاده می شود. **دقت نمائید نمونه نباید منجمد گردد.**

۳. مدفوع:

مقدار ۲ تا ۵ گرم مدفوع (آبکی یا غیرآبکی) را ظرف استریل مخصوص جمع آوری خلط که درب پیچدار داشته و غیرقابل نشت باشد جمع آوری نمایید. نمونه را تا زمان ارسال (ماکزیمم ۷۲ ساعت) در درجه حرارت پائین یخچال (۲ الی ۸ درجه سانتی گراد) نگهداری نمائید. اگر بیش از ۷۲ ساعت برای ارسال نمونه زمان لازم است نمونه را در سرمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد منجمد (فریز) نمائید و در شرایط منجمد آنرا منتقل نمائید.

۴. حمل و نقل نمونه:

نمونه های بیماران مشکوک به عفونت کوروناویروس جدید باید بر اساس دستورالعمل های انجمن حمل و نقل هوایی بین المللی (IATA) بسته بندی و حمل و نقل گردند. اگر در ارسال نمونه ها تاخیر وجود دارد و باید نمونه را به مدت زیاد برای مسافت های طولانی حمل و نقل نمود، می توان بطور ترکیبی از یخ خشک (جهت انجماد) و ice-pack ژلی استفاده نمود زیرا ice-pack های ژلی در صورت تمام شدن یخ خشک می توانند به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نمونه را در سرمای حرارت ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد حفظ نمایند.

دستورالعمل نحوه صحیح نمونه گیری از خلط:

1

درحالی که ناشتا هستید آب را در دهان تان غرغره کرده و دهان را بشویید



2

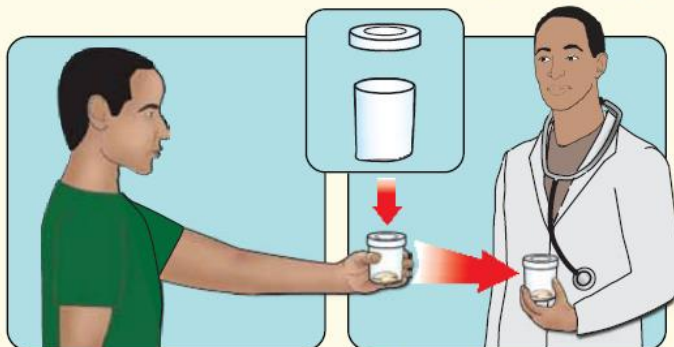
درب ظرف را باز کرده نفس عمیقی را از راه بینی کشیده و برای لحظه ای نفس خود را در سینه حبس کنید و با سرفه عمیق خلط خود را داخل ظرف مربوطه تخلیه نمایید.



سعی شود خلط با آب دهان مخلوط نگردد و یا آب دهان به جای خلط داده نشود. (آب دهان شفاف و رقیق است ولی خلط چسبندگی دارد.)

در صورتی که نتوانید با سرفه کردن برای انجام آزمایش نمونه خلط بدهید سر را روی بخار آب گرفته استنشاق نموده یا با آب نمک رقیق غرغره نمایید تا خلط بیاید

3



چنانچه نمونه گیری در منزل انجام شود، نمونه را پس از جمع آوری در یخچال قرار دهید و در کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه برسانید.

حجم نمونه باید در هر بار نمونه گیری حداقل ۲ ml (یک قاشق غذاخوری) باشد