

این راهنما به منظور ارائه اطلاعات علمی و فنی لازم بر اساس اصول و استانداردهای بین المللی در کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است.

اعضا کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی به ترتیب حروف الفبا عبارتند از:

-

-

ویراستار: آقای امیر سهرابی کارشناس ارشد ویروس شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت

بازبینی

دکتر مختاری آزاد

سرخجه

سرخجه (Rubella) يك بيماري ويروسي است. گاهي اوقات ضايعات پوستي آن شبیه سرخك يا مخمك تظاهر پيدا مي‌كند. اين بيماري در كودكان، نشانه‌هاي عمومي ندارد يا اينكه نشانه‌هاي بسيار جزئي دارد اما نزد بزرگسالان مي‌تواند به صورت تب خفيف ۱ تا ۵ روزه، سردرد، بيقاراي، ترشح خفيف بيني و التهاب ملتحمه بروز كند. از نشانه‌هاي باليني مشخص سرخجه التهاب غده‌هاي لنفاوي پشت چشم، زير استخوان پس سري يا پشت گردني مي‌باشد كه حدود ۵ تا ۱۰ روز قبل از ظاهر شدن ضايعات پوستي ايجاد مي‌شود. در ۵۰ درصد موارد ممكن است بيماري بدون ضايعات پوستي باشد

سرخك

سرخك يك بيماري عفوني و مسري در اثر يك ويروس RNA از خانواده پاراميكسوويريده ايجاد مي‌شود. توسط ترشحات تنفسي گسترش پيدا مي‌كند. بيماري با يك علامت اوليه مشخص مي‌شود كه به مدت ۳ تا ۵ روز دوام دارد و شامل سرفه، آبريزش بيش از حد از بيني، التهاب ملتحمه، بي‌حالي، بي‌اشتهائي و تب بالا رونده تا $39/5^{\circ}\text{C}$ مي‌گردد. خال‌هاي كاپليك (Koplik's Spots) را مي‌توان در غشاء مخاطي دهان يا لبها طي دوره علامت اوليه تشخيص داد كه مشخصه سرخك مي‌باشند. بيماري سرخك شديد مسري است و سرايت آن اغلب بطور مستقيم يعني از راه تماس صورت ميگيرد.

اوريون

ويروس اوريون از راه تنفس انتشار يافته و به گونه پاراميكسو ويروس تعلق دارد. شايع ترين نماي باليني اوريون تورم غدد بزاقی به ویژه غدد بناگوشي است. بيماران معمولاً تبی با درجه کم، سندرم خستگی مزمن (Fatigue Syndrome) و درد غدد بناگوشي دارند كه بعد از ۲ تا ۳ روز چنان بزرگ مي‌شود كه زاويه فك تحتاني را مسدود مي‌نمايد. تورم معمولاً دو طرفه است و تا مدت ۷ تا ۱۰ روز باقي مي‌ماند. انسان ها تنها مخزن شناخته شده آن مي‌باشند و فقط يك نوع آنتي ژني از ويروس وجود دارد. واكسن ويروس زنده و تضعيف شده آن بسيار مؤثر است و در تركيب با واكسن هاي سرخك و سرخجه تزريق مي‌گردد.

تهيه نمونه

۱- نمونه گلو: جهت انجام بررسي ويرولوژي تهيه نمونه گلو لازم مي‌باشد.

زمان نمونه گيري: يك هفته قبل از بروز علائم تا دو هفته بعد از بروز علائم مي‌توان نمونه گير ي كرد ولي بهترين زمان ۵ روز اول بعداز بروز بثورات جلدي در سرخك و سرخجه و يا بروز علائم در بيماري اريون است

روش کار:

الف) روش غرغره کردن:

- ۱- دو میلی لیتر محیط مخصوص انتقال (نمونه ویروس)، غرغره شود. این نمونه باید با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها و حداکثر طی ۴۸ ساعت در شرایط سرد به آزمایشگاه ملی سرخک، ارسال گردد. البته به نظر می رسد بدلیل ایجاد آلودگی های که ممکن است در این روش پیش آید، بهتر است حداقل امکان از روش های اشاره شده در ذیل استفاده گردد.
- ۲- در مواردی که امکان ارسال در مدت زمان فوق امکان پذیر نباشد نمونه در فریزر $C \square 70$ - یا پائین تر نگهداری شود.

ب) روش سواب:

- ۱- در مواردی که امکان غرغره کردن نباشد (مانند کودکان)، از سواب استریل از جنس الیاف مصنوعی مانند داکرون (Dakron) و یا ریون (Rayon) برای نمونه گیری استفاده شود.
 - ۲- سواب را چندین بار بر روی انتهای حلق (نازوفارنکس) بکشید بطوریکه سلولهای اپیتلیال کنده شده به آن بچسبند.
 - ۳- سواب را در لوله در پیچ دار حاوی دو میلی لیتر محیط مخصوص انتقال، قرار داده و خوب تکان دهید و سر سواب را بشکنید تا بتوانید در لوله در پیچ دار را ببندید.
- با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها، نمونه را در دمای مناسب (۴-۸ درجه سانتیگراد) و در اسرع وقت (طی ۴۸ ساعت)، به آزمایشگاه ملی سرخک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ارسال نمایند.
- در مواردی که امکان ارسال در مدت زمان فوق امکان پذیر نباشد نمونه در فریزر $C \square 70$ - یا پائین تر نگهداری شود.

۲- نمونه ادرار:

روش کار:

- ۱- ۲۰ تا ۵۰ سی سی ادرار (ترجیحا" ادرار اول صبح) در ظرف استریل گرفته شود و بلافاصله با رعایت زنجیره سرما (۴-۸ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه، ارسال گردد.
 - ۲- در آزمایشگاه لوله حاوی نمونه را در سانتریفوژ یخچال دار (۴-۸ درجه سانتیگراد) با دور ۱۵۰۰rpm یا ۵۰۰g به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، سانتریفوژ نمایید.
 - ۳- مایع رویی را دور بریزید.
 - ۴- رسوب حاصل را در یک میلی لیتر محیط ترانسپورت به صورت تعلیق در آورید.
 - ۵- محلول فوق را در لوله های در پیچ دار ریخته و در آن را محکم ببندید.
 - ۶- با هماهنگی کارشناس مسئول بیماریها، طی مدت ۴۸ ساعت در شرایط سرد به آزمایشگاه ملی سرخک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ارسال نمایید.
- تذکر ۱:** نمونه ادرار نباید قبل از عمل تغلیظ ادرار (سانتریفوژ کردن)، منجمد شود.

تذکر ۲: نمونه ادرار باید طی مدت ۱۰ روز اول بعد از شروع راش، جمع آوری شود.

تذکر ۳: نمونه ادرار باید در ظرف استریل، جمع آوری شود.

تذکر ۴: نمونه ادرار باید تا زمان سانتریفوژ در درجه حرارت ۴-۸ درجه سانتیگراد قرار گیرد.

تذکر ۵: ارجحیت عمل سانتریفوژ در ۲۴ ساعت اول جمع آوری نمونه است.

تذکر ۶: رسوب ته نشین شده باید به لوله حاوی یک میلی لیتر محیط ترانسپورت منتقل شود و در درجه حرارت ۴-۸ درجه سانتیگراد و حداکثر طی مدت ۴۸ ساعت به آزمایشگاه رفرانس منتقل شود. در غیر این صورت نمونه را در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود

۳- نمونه خون کامل برای آزمایشات سرولوژیک و جداسازی ویروس از سلول های تک هسته ای خون محیطی(PBMC):

۱- توسط سرنگ استریل حداقل ۵ میلی لیتر از خون، در لوله برچسب دار استریل و حاوی EDTA جمع آوری شود.

۲- نمونه خون می تواند در دمایی ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه فرستاده شود و حداکثر به مدت ۴۸ ساعت بعد از جمع آوری نمونه PBMC ها باید از خون کامل جدا گردند.

۳- نمونه خون کامل، نباید منجمد شود.

۴- به نسبت ۱:۱ خون و PBS مخلوط شود و سپس مخلوط فوق در یک لوله آزمایش مجزا و به آرامی بر روی ۲ میلی لیتر محیط جداسازی لئوسیت اضافه شود.

۵- لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمایی ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شود.

۶- برای از حرکت باز ایستادن روتور از ترمز سانتریفوژ استفاده نشود.

۷- به آرامی و با دقت توسط پی پت پاستور حلقه سفید تشکیل شده که در بالای رسوب گلبول های قرمز و حاوی PBMC می باشد جمع آوری شود و در یک لوله آزمایش جدید ریخته شود .

۸- به میزان ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر PBS به این لوله جدید اضافه شود .

۹- پس از سانتریفوژ رسوب ایجاد شده را با استفاده از محیط کشت سلول فاقد سرم مانند (DMEM) سوسپانسیون تهیه شود .

۱۰- سوسپانسیون بدست آمده به ۲ لوله مجزا تقسیم شود و در دمایی ۷۰- درجه سانتیگراد قرار داده شود .

شرایط نگهداری و ارسال نمونه ها برای انجام آزمون RT-PCR :

۱-نمونه ها را حداکثر تا ۴۸ ساعت با رعایت زنجیره سرد (۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه رفرانس ارسال نمایید .

۲- هرگز نمونه ها را در دمایی ۲۰- درجه سانتیگراد قرار ندهید و از ذوب و منجمد نمودن آن پرهیز کنید.

۳- در صورت عدم امکان ارسال ظرف ۴۸ ساعت نمونه ها را در دمای ۷۰- درجه قرار دهید و جهت ارسال نمونه ها از یخ خشک و لوله های درپیچ دار استفاده نمایید .

۴- در صورت عدم وجود فریزر ۷۰- درجه نمونه ها را در ۴ درجه نگهداری کنید و در اسرع وقت با رعایت زنجیره سرد (۴ درجه سانتیگراد) به آزمایشگاه رفرانس ارسال نمایید.

توجه:

در موارد سندرم سرخجه مادر زادی (CRS) نیز نمونه های ترشحات نازوفارنجیال ، ادرار ، CSF و PBMC می توان استفاده نمود .

- در موارد مننژیت ناشی از اریون در ۱۰ روز اول شروع بیماری نمونه مایع نخاع در شرایط استریل تهیه و در شرایط سرد به آزمایشگاه ارسال شود و یا در فریزر ۷۰- تا زمان ارسال نگهداری شود.

- محیط مخصوص انتقال نمونه با هماهنگی آزمایشگاه ملی سرخک در اختیار قرار خواهد گرفت.

- با هر نمونه، یک فرم ارسال نمونه تکمیل می گردد.

تشخیص آزمایشگاهی:

تشخیص آزمایشگاهی عوامل مذکور به طرق ذیل صورت می پذیرد.

۱- تشخیص سریع رنگ آمیزی فلورسنت آنتی بادی

۲- آزمایشات سرولوژیک

۳- کشت ویروس

آزمایشات ملکولی