

## 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 آنتراسیس 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 میکروارگانیسم 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 ذخیره 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 زا 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، اگزما 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 با سیلوس 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 زنجیره های 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:** سوپ 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 ۲-۸ 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 در لوله در پیچ دار	یک سواب برای اسمیر مستقیم و کشت -سواب دوم برای PCR
	اسکار/ زخم	۲ عدد سواب	سواب استریل مرطوب شده با سرم فیزولوژی یا آب مقطر استریل در لوله در پیچ دار	یک سواب برای اسمیر مستقیم و کشت -سواب دوم برای PCR
سیاه زخم استنشاقی/ تنفسی	خون	۱۰ میلی لیتر	بطریهای کشت خون (پس از اضافه نمودن خون حتما تکان داده تا لخته نگردد.)	
	مایع مغزی نخاعی	۰,۵ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم -کشت -PCR
	سواب بینی	۲ عدد	سواب استریل در لوله در پیچ دار	اسمیر مستقیم -کشت
سیاه زخم گوارشی	خون	۱۰ میلی لیتر	بطریهای کشت خون	
	سرم	۲ سی سی	لوله در پیچ دار	آزمون های سرولوژی -فاکتور کننده*
	مایع آسیت	۲ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم -کشت -PCR -فاکتور کننده
	مایع پریتون	۲ میلی لیتر	لوله در پیچ دار استریل	اسمیر مستقیم -کشت -PCR -فاکتور کننده
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 سرولوژی -فاکتور کننده*

\*جهت شناسایی فاکتور کننده نمونه پلازما ارجحیت دارد

### ۳- روش های تشخیص مولکولی

روش های مولکولی بسیار حساس و اختصاصی بوده و بر پایه شناسایی ژن های کروموزوم با سیلوس آنترا سیس و ژن های پلاسמיד 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 ، با سیلوس آنترا سیس 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 انترا سیس 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 سانتریفیوژ 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	۱	متغیر	اختصاصی نیست	مشکوک
	رنگ آمیزی پلی کروم متیلن بلو کشت	۱	متغیر	٪۱۰۰	محتمل
	PCR(PA DNA) ELISA(PA) ELISA(anti PA)	۱۸-۲۴	بالا	٪۱۰۰	تاییدی
		۷-۸	بالا	٪۱۰۰	محتمل
		۴	متغیر	٪۱۰۰ (جهت نمونه های تازه)	محتمل
		۴	متغیر		جهت پی گیری دوران نقاهت
		پایین	بالا		

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. از سال نمونه های بیولوژیک در گروه B مواد عفونی قرار 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- سوپاها: 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، بطریقه های کشت خون و سایر مایعات استریل بدن باید در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل گردند.

### سطح بندی ارائه خدمات آزمایشگاهی تشخیص سیاه زخم :

اولین سطح ارائه خدمات آزمایشگاهی تشخیص سیاه زخم، آزمایشگاه های مرکز بهداشت شهرستان، بیمارستان و درمانگاه های دولتی/ خصوصی است که دارای بخش میکروب شناسی فعال بوده و کارکنان آن خصوصاً در بخش میکروب شناسی آموزش های لازم را دیده باشند. آزمایشگاه های سطوح بالاتر نظیر آزمایشگاه مرجع استان / مرجع دانشگاهی نیز در صورتی که شرایط مورد اشاره را دارا بوده صلاحیت انجام کار تشخیصی بر روی نمونه های محتمل و مشکوک انتراکس و تایید نتایج سطح اول می باشند. شایان ذکر است که حداقل در آزمایشگاه مرجع کشوری باید دسترسی به آزمایش های سرولوژیک جهت بررسی های اپیدمیولوژیک و سایر موارد ایجاد گردد.

با توجه به ریسک بالای انجام آزمایش های میکروب شناسی مبتنی بر کشت باسیلوس آنتراسیس، انجام آزمایش های میکروب شناسی مبتنی بر کشت باید در آزمایشگاه هایی انجام شود که دارای امکانات مناسب با سطح ایمنی زیستی این عامل بیماری زا باشند.

### آزمایشگاه مرکز جامع روستایی / شهری روستایی

در صورت مراجعه افراد با زخم مشکوک و درخواست آزمایش بدون هیچ مداخله تشخیصی بیمار باید به نزدیک ترین آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان، بیمارستان ها یا درمانگاه های دولتی که شرایط اولین سطح ارائه خدمات آزمایشگاهی را داشته باشند، ارجاع شود. در مواردی که فاصله مرکز از آزمایشگاهی که مسئول ارائه خدمت تشخیصی سیاه زخم است زیاد است، مسئولیت فراهم کردن تسهیلات ارجاع بر عهده مرکز می باشد.

### آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان

در آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان که به عنوان اولین سطح ارائه خدمت محسوب می شود، در صورت وجود بخش میکروب شناسی فعال و کارکنان آموزش دیده در مراجعه فرد با زخم مشکوک به باسیلوس آنتراسیس باید با رعایت الزامات ایمنی زیستی و بر اساس دستورالعمل، بوسیله پزشک، کارکنان آزمایشگاه و یا هر فرد آموزش دیده ای نمونه گیری از ضایعات پوستی انجام و اقدامات زیر صورت پذیرد:

۱. انجام آزمایش تشخیص سیاه زخم از طریق دید مستقیم: نمونه ضایعات پوستی برای تهیه گسترش، انجام رنگ آمیزی، آزمایش دید مستقیم و گزارش فوری نتیجه آن، باید در همان مرکز تهیه و مورد آزمایش قرار گیرد.
۲. نمونه گیری به منظور انجام آزمایش های باکتریولوژیک و تشخیص مولکولی: باید از ضایعات پوستی مشکوک نمونه تهیه شود و با رعایت استاندارد بسته بندی و الزامات انتقال امن و ایمن نمونه های بالینی به آزمایشگاه مرجع استانی / دانشگاهی ارسال گردد.

پس از بررسی گسترش تهیه شده از بیمار مشکوک به آنتراسیس، چه باسیل مشکوک به باسیلوس آنتراسیس دیده شده باشد، و چه دیده نشده باشد، باید کلیه نمونه های مشکوک (اسمیر و سوپ از ضایعات) جهت تایید تشخیص به آزمایشگاه مرجع دانشگاهی ارسال شود. در صورتی که در آزمایشگاه مرجع دانشگاهی امکان انجام PCR بر روی نمونه های آنتراکس پوستی وجود نداشته باشد، آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان موظف است نمونه را به انستیتو پاستور ارسال کند.

### بیمارستان‌ها و درمانگاه‌های دولتی / خصوصی

در صورت مراجعه فرد با زخم مشکوک به باسیلوس آنتراسیس باید با رعایت الزامات ایمنی و بر اساس دستورالعمل نمونه گیری، از ضایعات گسترش تهیه شده و رنگ آمیزی گرم شود؛ و در صورت امکان پلی کروم متیلن بلو انجام شود. اگر در گسترش رنگ آمیزی شده باسیل‌های مشکوک دیده شود (مراجعه به بند ۱) یا در کشت زخم یا مایعات بیولوژیک به طور اتفاقی کلنی مشکوک به باسیلوس آنتراسیس دیده شود، باید نمونه بالینی و / یا پلیت کشت میکروبی بدون انجام پاساژ یا روش های فنوتیپینگ جهت تایید تشخیص با رعایت الزامات انتقال امن و ایمن نمونه، به انستیتو پاستور ایران ارسال شود.

### آزمایشگاه مرکز بهداشت استان / مرجع دانشگاهی

در این سطح علاوه بر تهیه گسترش و رنگ آمیزی باید امکانات تشخیص مولکولی فراهم گردد. در صورتی که این امکانات وجود داشته و صحت عملکرد آن مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت باشد، نمونه‌ها باید از سطوح پایین‌تر، بیمارستان‌ها و درمانگاه‌های دولتی / خصوصی نیز به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان / مرجع دانشگاهی ارجاع شود. در غیر این صورت نمونه بالینی مشکوک باید با رعایت الزامات انتقال امن و ایمن نمونه به انستیتو پاستور ایران یا آزمایشگاهی که قرار است خدمات تخصصی ارائه دهد و مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت است ارسال شود

با توجه به ریسک بالای انجام آزمایش‌های میکروبی‌شناسی مبتنی بر کشت باسیلوس آنتراسیس، انجام آزمایش‌های

میکروبی‌شناسی مبتنی بر کشت باید در آزمایشگاه‌هایی انجام شود که دارای امکانات مناسب با سطح ایمنی زیستی این عامل بیماری‌زا باشند.

### آزمایشگاه مرجع کشوری (انستیتو پاستور ایران):

در انستیتو پاستور ایران آزمایش دید مستقیم، آزمایش تشخیص مولکولی و در صورت فراهم آمدن الزامات ایمنی و امنیت زیستی، انجام آزمایش‌های میکروبی‌شناسی مبتنی بر کشت و روش‌های فنوتیپینگ برای تشخیص عامل بیماری انجام می‌شود.

**محل ارسال نمونه ها: خیابان کارگر جنوبی - میدان پاستور - انستیتو پاستور ایران کلینیک خدمات تخصصی**

**تلفن: ۶۴۱۱۲۱۹۱**

**نمونه ها باید به همراه نامه درخواست آزمایش به آزمایشگاه ارسال گردد**