

بیوپسی مغزی در هاری

(تشخیص پس از مرگ) مطابق دستور عمل های۱۴۰۴

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 دستورالعمل محل دقیق نمونه‌برداری را برای افزایش دقت تشخیص مشخص می‌کند، که طبق آخرین پروتکلهای سال ۲۰۲۵ برای نمونه برداری و بررسی بافت مغز در موارد مشکوک به هاری توسط سازمان پزشکی قانونی برای تهیه نمونه از محل صحیح ارائه شده است.

موارد تجویز آزمایش پس از مرگ

- **بررسی اپیدمیولوژیک**

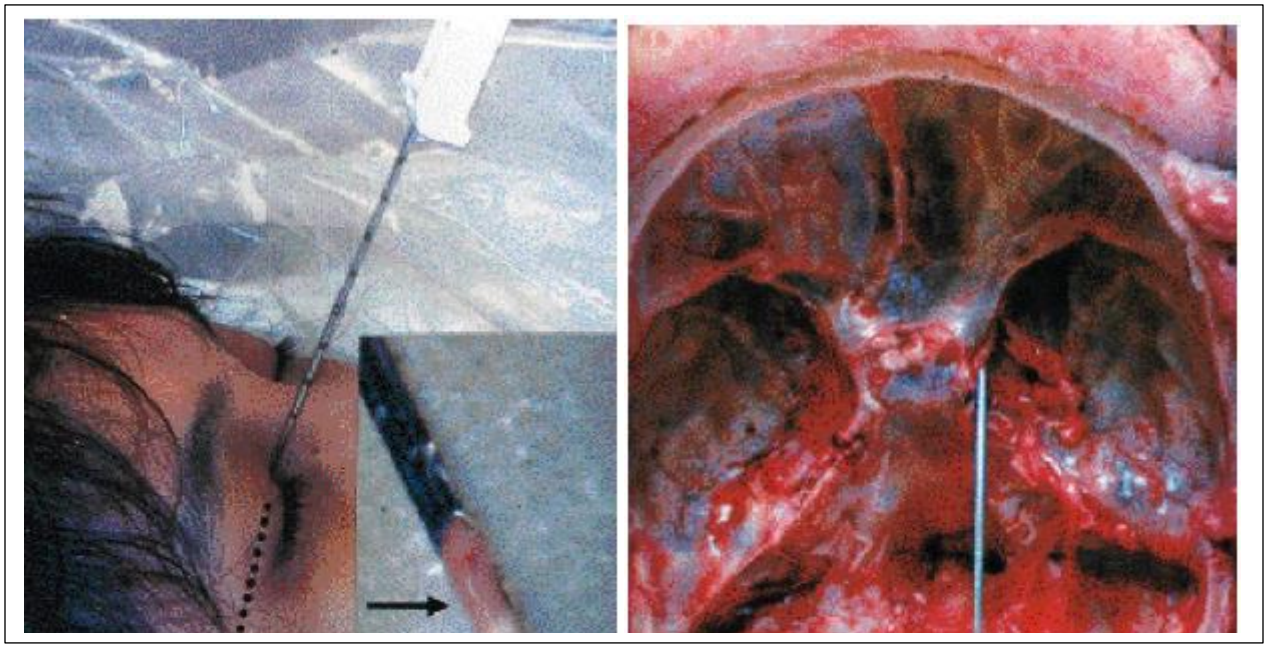
نیاز به بررسی اپیدمیولوژیک و ردیابی موارد هاری به ویژه در رویدادهای اپیدمیک.

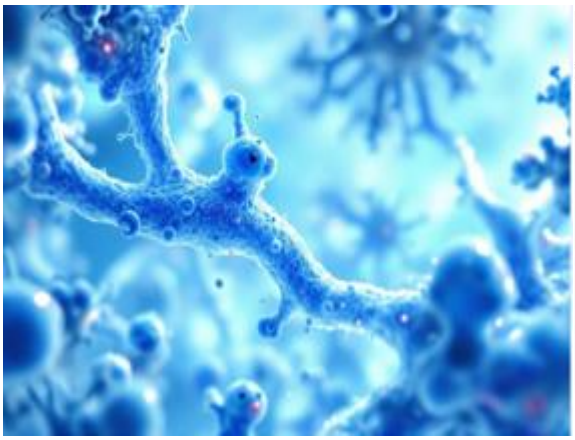
- **PCRبزاق منفی**

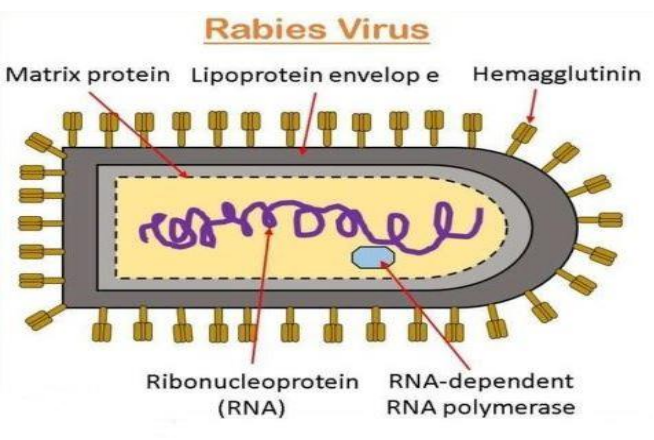
در تشخیص پیش از مرگ PCR بزاق منفی باشد یا جواب هنوز حاضر نباشد ولی شک بالینی بالا وجود داشته باشد.

- **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 : ا تا ۴ ساعت

دقت : بالای ۹۹ 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 نمونه‌های 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 اره های مولد آئروسل پرهیز شود، در صورت اجبار، در کابین ایمنی زیستی تایید شده یا با سیستم تهویه موضعی انجام شود.

تجهیزات مورد نیاز جهت نمونه‌برداری مغز برای بررسی ویروس هاری

❖ **ماشین مو تراشی:** جهت تراشیدن موهای ناحیه جمجمه و آماده‌سازی محل نمونه‌برداری

❖ **چاقوی اسکالپل:** برای ایجاد برش‌های دقیق در پوست و بافت‌های سطحی

❖ **پنس:** جهت نگه‌داشتن و جابجایی بافت‌ها بدون آسیب

❖ **سوزن بیوپسی:** برای برداشت نمونه‌های بافتی از نواحی خاص مغز

❖ **سوزن مخصوص نمونه‌برداری 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 نمونه‌برداری از بافت مغز جهت بررسی ویروس هاری، باید از وارد شدن هرگونه آسیب مکانیکی مانند له‌شدگی به نمونه‌ها جلوگیری شود. نمونه‌ها باید با دقت و ظرافت تهیه شوند تا ساختار سلولی آن حفظ گردد.
- ❖ توصیه می‌شود نمونه از ناحیه‌ی ساقه مغز تهیه شود، چرا که این ناحیه از نظر تشخیص ویروس هاری حساسیت بالاتری دارد.
- ❖ اندازه‌ی هر قطعه نمونه باید به صورت برش‌هایی با قطر حدود ۴ میلی‌متر و حجم تقریبی ۲ میلی‌متر مکعب باشد.
- ❖ پس از تهیه، نمونه‌ها باید در یکی از شرایط زیر نگهداری و ارسال شوند:
  - درون گاز استریل آغشته به نرمال سالین قرار داده شده در ظرف ضد نشت
  - کیت‌های 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 آنتی‌ژن و ژنوم ویروس، اختلال در نتایج آزمایشهای ایمونوفلورسانس و مهارکننده 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 مانندdFAT

می‌توان از روش‌های زیر استفاده کرد:

۱- بیوپسی از ناحیهRetro-orbital

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

۲- نمونه‌برداری از مسیر اکسیپیتال

- از ناحیه پس‌سری (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 (۲تا 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(بسته‌بندی سه‌لایه 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 فورا 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**

PCRحساس 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 برچسب‌گذاری و اطلاعات همراه نمونه مشکوک به هاری

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

۱. **برچسب‌گذاری دقیق روی ظرف نمونه** شامل:

- عبارت: "**مشکوک به هاری – خطر زیستی**" به‌صورت 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 جداگانه‌ای درج و داخل بسته قرار داده شود، شامل:

- مشخصات فرد مشکوک (نام، سن، جنسیت، تاریخ مواجهه با حیوان)
- تاریخچه بیمار
- تاریخ و ساعت نمونه‌برداری
- نوع نمونه و روش نگهداری
- نام و امضای مسئول نمونه‌برداری

حتما قبل از ارسال، اطلاعات و تاریخچه بیمار به مرکز مدیریت بیماری های واگیر وزارت بهداشت اطلاع داده شود.