Archive of SID

طب نظامی
زمستان۱۳۸۱، شماره ٤(٤)
صفحات: ۲۸۰-۲۷۳

تشخیص آزمایشگاهی و جنبه‌های ایمنی زیستی جنگ‌افزارهای بیولوژیک

رضا میرنژاد .MS.c

آدرس نویسنده: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) - پژوهشکده طب رزمی- مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

خلاصه

در سال‌های اخیر تعداد معدودی حوادث بیوتروریسمی رخ داده است. از این رو، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با روش‌های تشخیص و درمان عوامل بیولوژیک آشنایی کامل ندارند. لذا بایستی آنها را با روش‌های فرآوری و تشخیص این عوامل آشنا نمود و نقش آنها را در حملات بیولوژیک گوشزد کرد. به‌طوری که آمادگی لازم را برای مواجه با حملات بیوتروریستی کسب نموده و بدانند که در هنگام وقوع حملات بیولوژیک چه اقدامی باید انجام دهند. از این رو، مرکز پیش‌گیری و کنترل بیماری‌ها (CDC) اقدام به راه‌اندازی شبکه آزمایشگاهی به‌منظور تشخیص و درمان عوامل بیولوژیک نموده است. با آن‌که در حملات بیولوژیک ممکن است از تعداد معدودی از عوامل استفاده گردد. با این حال، این آزمایشگاه‌ها قادرند با کمک تست‌های تشخیصی و سایر امکانات تعداد زیادی از عوامل بیولوژیک را شناسایی نمایند. لذا این تحقیق به بحث و بررسی روش‌های تشخیص آزمایشگاهی و شرایط ایمنی‌زیستی پرداخته است.

واژه‌های کلیدی: بیوتروریسم، جنگ بیورلوژیک، باسیلوس آنتراسیس، فرانسیسلا تولارنسیس، کلستریدیم بوتولینوم

ایمنی‌زیستی

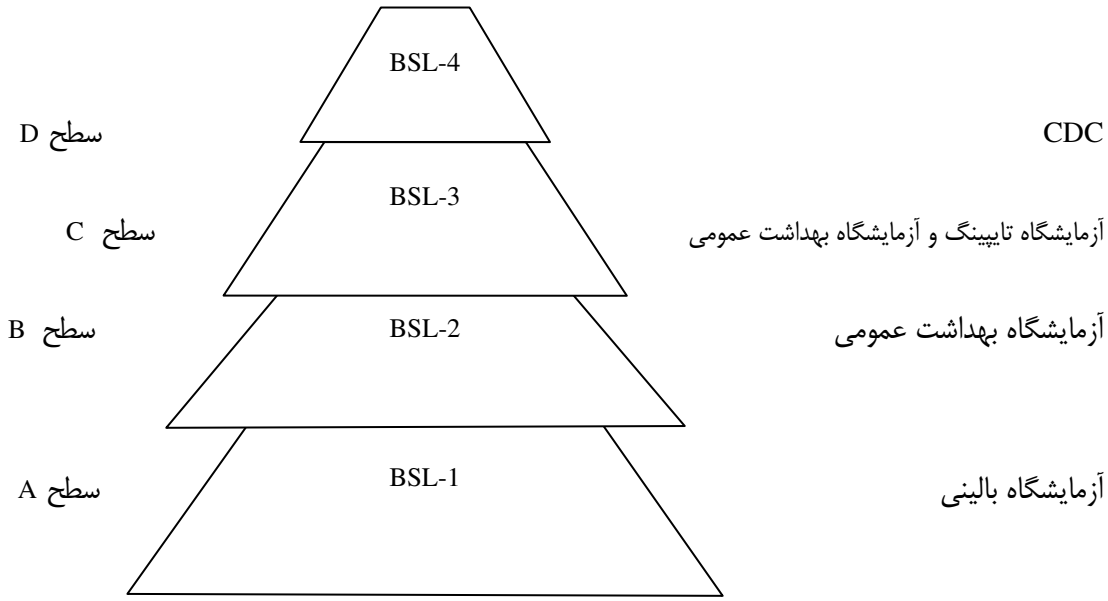
عقیده براین است که، به‌طور بالقوه عوامل بیولوژیک زیادی برای استفاده در جنگ‌های بیولوژیک وجود دارد ولی خوشبختانه تعداد کمی از آنها قابلیت کاربرد و تأثیر کافی در بین مردم دارند. از خصوصیات مهم عوامل بیولوژیک می‌توان به‌تلفات زیاد، سهولت تولید و انتشارآسان، پایداری بالا، انتقال از طریق هوا(آئروسل)، انتقال از فرد به‌فرد، مقاومت زیاد به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد و عدم پیش‌گیری با واکسن‌ها اشاره کرد. با توجه به‌این خصوصیات عوامل بیولوژیک به باکتری‌ها(باسیلوس آنتراسیس، گونه‌های بروسلا، کلستریدیم بوتولینوم، یرسینیا پستیس و فرانسیسلا تولارنسیس) و نیز ویروس‌ها (آبله و ویروس‌های عامل تب‌های هموراژیک) محدود شده است. در میان آنها باسیلوس آنتراسیس و آبله دو عامل مهمی هستند که بیشتر در اهداف خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند.

به‌دلیل نادر بودن حوادث بیوتروریسمی، آزمایشگاه‌های بالینی به‌ندرت با این عوامل مواجه شده‌اند. لذا پرسنل آزمایشگاه با ویژگی‌ها و مشخصات این عوامل و نحوه بررسی و فرآوری نمونه‌های بالینی مصدومین بیولوژیک آشنا نیستند. ممکن است به‌خاطر حوادث اخیر آزمایشگاه‌های بالینی نمونه‌های کلینیکی یا محیطی را که ناشی از حملات بیولوژیک حقیقی یا فریبکارانه باشد دریافت کنند. بنابراین، آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی باید به‌روش‌ها و اقدامات احتیاطی در مواجه با این عوامل آشنا باشند. با وجود این، به‌منظور ایجاد آمادگی‌های لازم در مواجه با حملات بیولوژیک، مرکز کنترل و پیش‌گیری بیماری‌ها(CDC) شبکه

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاهی ایجاد کرده است کـه مـسئول شناسـایی و تـشخیص عوامل بیولوژیک است. فعالیـت ایـن شـبکه براسـاس روش‌هـای آزمایشگاهی است. بر اساس توانایی‌ها، آزمایشگاه‌های ایـن شـبکه به ۴ سطح(A - D) دسته‌بندی شده‌اند. آزمایشگاه سطح A حداقل امکانات لازم برای تشخیص نمونـه‌هـای مـشکوک بـا اسـتفاده از تست‌های ساده را دارد. این آزمایشگاه باید نمونه‌های مـشکوک را به آزمایشگاه با سطح بالاتر ارسال کند. آزمایشگاه سطح D



شکل ۱:سطوح طبقه بندی شبکه آزمایشگاه‌های مسئول شناسایی و تشخیص عوامل بیولوژیک

همانند آزمایشگاه‌های با تـسهیلات ایمنـی‌زیـستی سـطح ۴ CDC می‌باشند و دارای بالاترین توانایی و امکانات پیشرفته می‌باشد. بـر اساس استانداردهای موجود بیشتر آزمایشگاه‌های تـشخیص طبـی بیمارستانی و خصوصی در سطح A قرار می‌گیرنـد. ولـی بعـضی از آنهـا ازنظـر سـطوح ایمنـی‌زیـستی در سـطح ۲ قـرار دارنـد. آزمایشگاه‌های سطح A بیشتر در زمینه جمع‌آوری، انتقال، کشت و فرآوری نمونه‌ها فعالیت می‌کنند. اگرچه این آزمایـشگاه‌هـا ممکـن است از آلودگی نمونه‌های دریافتی با عوامـل بیولوژیـک اطلاعـی نداشته باشند ولی بایـد امکانـات و تجهیـزات ضـروری و مناسـب درخصوص تشخیص و جداسـازی ایـن‌گونـه عوامـل را در اختیـار داشته باشند.

درحال حاضر همه آزمایشگاه‌های بالینی که نمونـه‌هـای بـالینی و محیطی را دریافت می‌کنند باید دارای استانداردهای زیر باشند:

۱- نسبت به سطوح ایمنی‌زیستی موجود آزمایشگاه آگـاهی کامـل داشته باشند.

۲- تهیه و تکمیل پروتکل‌های مربوط به زنجیره نظارتی.

۳- وجـود روش‌هـای اسـتاندارد جمـع‌آوری، نگهـداری، انتقـال نمونه‌ها، کشت و شناسایی عوامل مورد هدف را داشته باشند.

۴- از نزدیک‌ترین آزمایشگاه رفرانس با سطح بالاتر از خود آگاهی داشته باشند. همچنـین راهنمـای جدیـدی درخـصوص فـرآوری و انتقال عوامل بیولوژیک تهیه کنند.

۵- از ویژگی‌های مهم عوامل بیولوژیک احتمالی شـناخت داشـته باشند.

کنترل آلودگی مـستلزم اسـتفاده از روش‌هـای ایمنـی مناسـب در فرآوری نمونه‌های عفونی در محیط آزمایشگاه می‌باشـد. هـدف از این کنترل کاهش یا حذف آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه، بـا عوامل بالقوه خطرناک می‌باشد.کنترل در مرحله اول شـامل عـدم آلوده شدن پرسنل، محیط آزمایشگاه و در مرحله بعد آلوده نـشدن محیط بیرون آزمایشگاه می‌باشد.

۳ عامل مهم ایمنی آزمایشگاه‌ها عبارتند از:

۱- مجموعه اعمال و تکنیک‌های آزمایشگاهی

۲- تجهیزات ایمنی

۳- امکانات و تسهیلات آزمایشگاهی.

www.SID.ir

Archive of SID

پرسنل آزمایشگاه باید در هنگام کار با نمونه‌های کلینیکی از حوادثی که او را تهدید می‌کند با اطلاع باشد. لذا مهمترین فاکتور در کنترل، توجه فراوان به‌روش‌ها و تکنیک‌های استاندارد میکروبیولوژی در آزمایشگاه می‌باشد. هرآزمایشگاه باید اصول ایمنی‌زیستی خود را توسعه دهد. از این‌رو، برای کاهش آلودگی پرسنل ضروری است از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی استفاده کرده و با آموزش‌های لازم از روش‌های تشخیص آلودگی و جلوگیری از انتشار آن اطمینان حاصل کنند.

تجهیزات و وسایل ایمنی در مقابل مواد بیولوژیک جزء محافظ‌های اولیه می‌باشند. از تجهیزات ایمنی می‌توان به هودهای بیولوژیک، محفظه‌های در بسته و دیگر وسایل محافظت‌کننده اشاره کرد. پرسنل آزمایشگاه ازدستکش، ماسک صورت و عینک‌های ایمنی در کنار هودهای بیولوژیک استفاده می‌کنند. کار با ارگانیسم با خطر متوسط مانند ویروس هپاتیتB و سالمونلا که سبب بیماری شدید می‌شوند باید درآزمایشگاه با سطح ایمنی زیستی ۲ انجام شود. مخاطرات اولیه برای پرسنلی که با این عوامل کار می‌کنند مربوط به‌تماس اتفاقی غشای مخاطی یا از طریق امروزه ۳ نوع هود ایمنی وجود دارد که شامل کلاس‌های ۱ و ۲ که جلوی آن باز می‌باشند و مانع آلودگی پرسنل و محیط آزمایشگاه می‌شوند. کلاس۳ بدون منفذ و دارای بالاترین قدرت محافظت‌کننده پرسنل و محیط از آلودگی می‌باشد که بسته به‌قدرت انتشار عوامل محافظ ثانویه در طراحی و ساخت آزمایشگاه درنظر گرفته می‌شوند(جدول ۱). با کمک این حفاظ‌ها، پرسنل و محیط اطراف آزمایشگاه از آلودگی با عوامل بیولوژیک حفظ می‌شوند.

سطح ایمنی‌زیستی۱ (BSL –1) نماینده سطحی از محدودیت است که هیچ‌نوع موانع اولیه و ثانویه اختصاصی در آن توصیه نمی‌شود. در آزمایشگاه‌های با سطح ایمنی‌زیستی ۱ کار روی میکروارگانیسم‌هایی که در افراد بالغ سبب بیماری نمی‌شوند انجام می‌گیرد ولی این میکروارگانیسم‌ها در افراد کم‌سن، سالمندان و افراد مبتلا به‌نقض ایمنی یک عامل فرصت‌طلب می‌باشند.

جدول۱: سطوح ایمنی‌زیستی

سطح ایمنی‌زیستی(BSL)	عوامل	اقدامات	تجهیزات ایمنی	تسهیلات آزمایشگاهی
۱	عواملی که احتمالا در افراد بالغ ایجاد بیماری می‌کنند	اقدامات استاندارد میکروبیولوژی	نیازی نیست	نیازمند دستشوئی روی سکوها است
۲	عواملی که در ارتباط با بیماری در انسان می‌باشند. مخاطرات: عامل از طریق پوست آسیب دیده و از طریق غشای مخاطی وارد می‌شود.	اقدامات BSL-1 به‌اضافه: دسترسی به وسایل هشدار دهنده خطرات بیولوژیک، رعایت احتیاطات ایمنی‌زیستی با توجه به نیاز، به‌اضافه تسهیلات رفع آلودگی مواد استفاده شده و افراد ناظر	حفاظهای اولیه شامل هودهای کلاس I , II و دیگر کنترل های فیزیکی. ابزار لازم برای بررسی و دستکاری عوامل که امکان افشانه یا آئروسل شدن دارند. وسایل حفاظتی پرسنل: حفاظ آزمایشگاه دستکش و ماسک درصورت نیاز	BSL-1 به‌اضافه اتوکلاو
۳	عوامل بومی و خارجی که دارای پتانسیل انتقال تنفسی می باشند و سبب بیماری کشنده می شوند.	اقدامات BSL-2 به‌اضافه: تسهیلات لازم برای رفع آلودگی مواد استفاده شده آزمایشگاهی قبل از شستشو با سرم های خط اول	حفاظهای اولیه شامل هودهای کلاس I و II دیگر کنترل های فیزیکی. ابزار لازم برای بررسی و دستکاری عوامل که امکان افشانه یا آئروسل شدن دارند. وسائل حفاظتی پرسنل: حفاظ آزمایشگاه دستکش و ماسک در صورت نیاز.	BSL-2 به‌اضافه: جداسازی فیزیکی از طریق راهروها. اتاق ها دارای دو درب می باشد که در آنها تهویه مناسب صورت می گیرد به طوری که هوای نامطبوع داخل آزمایشگاه نشود.
۴-	عوامل خارجی و خطرناکی که دارای ریسک بالایی در ایجاد بیماری مرگ آور می باشند و ممکن است از طریق آئروسل انتقال یابند.	اقدامات BSL-2 به‌اضافه: تعویض لباس قبل از وارد شدن، دوش گرفتن در هنگام خروج، رفع آلودگی از همه مواد آلوده شده هنگام خروج	حفاظهای اولیه: هودهای کلاس I , II,III به اضافه استفاده از پوشش کامل بدن که دارای هوای با فشار مثبت است.	BSL-2 به‌اضافه: ساختمان مجزا یا ناحیه کاملا ایزوله شده که مجهز به تجهیزات و سیستم توزیع تخلیه و خلا و رفع آلودگی می باشد. در متن مقاله به وسایل مورد نیاز دیگر اشاره شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: ایمنی‌زیستی میکروبیولوژی برای عوامل جنگی بیولوژیک

عامل	BSL		احتیاطات لازم در آزمایشگاه سطح A	
	دستکاری نمونه‌ها	دستکاری کشت		
باسیلوس آنتراسیس	۲	۲	Bsl-2: فعالیت های در ارتباط با جمع‌آوری نمونه‌های کلینیکی و تشخیص کشت‌های عفونی	Bsl-3 : فعالیت‌های که پتانسیل پاشیده شدن و به صورت آئروسل درآوردن آنها در سطح بالایی قرار دارد.
گونه‌های بروسلا(a)	۲	۳	Bsl-2 : فعالیت های درخصوص جمع‌آوری، انتقال و کشت نمونه‌های کلنیکی	Bsl-3 : فعالیت‌های مربوط به بررسی کشت ها باید در این سطوح بررسی شود.
کلستریدیم بوتولینوم (b)	۲	۲	Bsl-2 : فعالیت‌های درخصوص نمونه‌های شناخته شده‌ای که دارای توکسین بالقوه می‌باشد. باید در زیر هود کلاس II بررسی شود و هود باید پوشش داشته باشد.	Bsl-3 : فعالیت‌هایی که پتانسیل پاشیده شدن و به صورت آئروسل درآوردن عوامل در سطح بالایی قرار دارد.
فرانسیسلاتولارنسیس (c)	۲	۲	Bsl-2 : فعالیت‌های محدود به جمع‌آوری انتقال و کشت نمونه‌های کلینیکی	Bsl-3 : همه فعالیت‌ها در ارتباط با دستکاری کشت
یرسینا پستیس(d)	۲	۲	Bsl-2 : فعالیت‌های مربوط به جمع‌آوری نمونه‌ها و تشخیص کشت‌های عفونی	Bsl-3 : موادی که پتانسیل پاشیده شدن و به صورت آئروسل درآوردن آنها در سطح بالایی قرار دارد.
آبله(e)	۴	۴	Bsl-2 : انتقال و جمع‌آوری نمونه	
ویروس تب هموراژیک(F)	۴	۴	Bsl-2 :انتقال و جمع‌آوری نمونه	

a) بروسلوزیس در آزمایشگاه از راه‌های بو کشیدن محیط کشت، آئروسل ایجاد شده از طریق سانتریفوژ، پیپت کردن با دهان، تلقیح تصادفی به پوست، پاشیدن به چشم و دهان و تماس مستقیم با نمونه‌های کلینیکی کسب می‌شود.

b) توکسین در آزمایشگاه از طریق تماس مستقیم با پوست، چشم یا غشای مخاطی دستگاه تنفس به انسان منتقل می‌شود. توکسین به وسیلهٔ هیدروکلرید سدیم ۱٪ مولار خنثی می شود. کلستریدیم بوتولینوم توسط سفیدکننده های خانگی با رقت $^{1}/_{10}$ غیر فعال می شود. مدت زمان مناسب ۲۰ دقیقه است. اگر نمونه هائی دارای هم توکسین و هم ارگانیسم می‌باشند آن را در سفیدکننده و هیدروکلریدسدیم برای مدت ۴۰ دقیقه قرار داده می‌شود

c) عفونت تولارمی اکتسابی در آزمایشگاه بیشتر از طریق تماس با کشت می‌باشد. تماس مستقیم پوست و غشای مخاطی با مایع کشت یا تلقیح داخل جلدی، خوردن و تنفس آئروسل ها سبب بیماری می‌شود.

d) مراقبت‌های خاص برای عدم تولید آئروسل باید انجام شود.

e) خوردن ، تلقیح داخل جلدی وورود آئروسل به غشاهای مخاطی یا پارگی پوست و نیز تماس با مایعات و بافت‌های آلوده جزء مخاطرات اولیه کارکنان آزمایشگاه می‌باشد.

f) آئروسل‌های عفونی، تماس غشای مخاطی با ذرات عفونی و تلقیح داخل جلدی تصادفی جزء مخاطرات اولیه برای کارکنان آزمایشگاه می‌باشد.

پوست و خوردن مواد عفونت‌زا است. اگرچه مشخص نیست ارگانیسم‌هایی که به‌صورت روتین در سطح ایمنی‌زیستی ۲ مطالعه می‌شوند از طریق آئروسل قابل انتقال باشند ولی باید حفاظت‌های اولیه و ثانویه در نظر گرفته شود. در ایمنی‌زیستی سطح ۳ (BSL – 3) همه توصیه‌ها درخصوص سطوح ایمنی‌زیستی رعایت می‌شود. ولی دراین سطح تاکید بیشتر برحفاظت‌های اولیه و ثانویه می‌باشد. مخاطرات اولیه که پرسنل آزمایشگاه را تهدید می‌کند، شامل تماس با آئروسل‌های عفونت‌زا، خوردن و تلقیح به‌خود در مناطق آلوده و پرجمعیت می‌باشد. مایکوباکتریم توبرکلوزیس و کوکسیلابورنتی نماینده میکروارگانیسم‌هایی هستند که در این سطح روی آنها کار می‌شود.

مطالعه روی عوامل خارجی خطرناک که قادر به‌ایجاد بیماری مرگ‌آور بوده و از طریق آئروسل منتقل می‌شوند، معمولاً هیچ‌گونه واکسن یا درمانی برعلیه آنها وجود ندارد. لذا باید در آزمایشگاه با سطح ایمنی‌زیستی ۴ (BSL – 4) انجام شود. مخاطرات اولیه برای کارکنان در این سطح که با این عوامل کار می‌کنند مربوط به‌تماس اتفاقی یا تلقیح به‌خود از طریق پوست می‌باشد. ایزوله کردن کامل کارکنان آزمایشگاه از مواد عفونت‌زای

www.SID.ir

Archive of SID

آئروسل شده، عمدتاً ازطریق کارکردن زیر هود کلاس۳ یا در محفظه‌هایی با پوششی کامل که دارای هوای فشار مثبت است صورت می‌گیرد(جدول ۲). اساساً عوامل ویروسی در این سطوح مطالعه می‌شوند.

بررسی نمونه و تشخیص کشت‌های آلوده به‌عوامل سازنده سلاح‌های بیولوژیک باید حداقل در آزمایشگاه‌های با امکانات ایمنی‌زیستی سطح ۲ (BSL – 2) انجام گیرد. لذا نمونه‌ها پس از دریافت باید علامت‌گذاری و در سطوح ایمنی‌زیستی ۱ و ۲ مورد بررسی قرار گیرند. بایستی از کشت دادن باکتری‌ها و دیگر فعالیت‌هایی که منجر به آئروسل شدن می‌گردد. در این سطوح ایمنی‌زیستی خودداری کرد. این‌گونه کارها باید در آزمایشگاه با سطح ایمنی‌زیستی ۳ انجام شود.

مطالعات باسیلوس آنتراسیس و یرسینیا پستیس و نمونه‌های حاوی توکسین بوتولیسم باید با امکانات آزمایشگاه با سطح ایمنی‌زیستی ۲ انجام شود. امکانات آزمایشگاه با سطح ایمنی‌زیستی ۲ و ۳ برای کار با فرانسیسلاتولارنسیس و گونه‌های بروسلا توصیه می‌شود. ویروس آبله و ویروس‌های تب هموراژیک شدیداً عفونت‌زا هستند. لذا جمع‌آوری، بررسی و تیمار نمونه‌ها باید در سطح ایمنی‌زیستی ۴ انجام شود.

باسیلوس آنتراسیس

عفونت‌های ناشی از باسیلوس آنتراسیس به ۳ شکل: پوستی، تنفسی و گوارشی در انسان و حیوان بروز می‌کند. باکتریمی به‌دنبال هریک از اشکال سیاه‌زخم به‌وجود می‌آید، افزون براین، مننژیت از عوارض باکتریمی می‌باشد. باسیلوس‌آنتراسیس‌باسیل گرم مثبت ـ اسپوردار، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری می‌باشد که در نمونه‌های کلینیکی به‌صورت زنجیره کوتاه و در محیط کشت به‌صورت زنجیره‌های بلند دیده می‌شود در بدن و در حضور CO2 اسپور تشکیل نمی‌شود. در حالی‌که کپسول پروتئینی در بدن تشکیل می‌شود ولی روی محیط‌های معمولی تشکیل نمی‌شود. کپسول به‌همراه توکسین دوعامل اصلی ویرولانس‌باسیلوس‌آنتراسیس می‌باشند. باسیلوس آنتراسیس همانند دیگر گونه‌های باسیلوس به‌آسانی کشت داده می‌شود و روی محیط‌های معمولی مانند SBA و شکلات آگار رشد می‌کند. این باکتری برعکس سایر گونه‌های باسیلوس روی SBA همولیز نمی‌دهد. محیط اختصاصی به‌نام پلی‌میکسین ـ لیزوزیم ـ EDTA ـ تالوزاستات یک محیط انتخابی برای جداسازی باسیلوس‌آنتراسیس از مدفوع و نمونه‌هایی با آلودگی بالا می‌باشد. همه محیط‌ها باید در ۳۵°C به‌مدت ۲۴–۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شوند.کلنی آن روی محیط نوترین آگارصاف تا محدب، ۵–۲ میکرومتر قطر و مشابه باسیلوس‌سرئوس سفید یا سفیدخاکستری با لبه‌های نامنظم و کشیده(ظاهر سرمدوزا) می‌باشد. کلنی‌ها اغلب یک قوام سخت دارد. باسیلوس‌آنتراسیس درحضور ۰/۷٪ کربنات‌سدیم و ۲۰–۵ درصد CO2 در محیط کشت تولید کپسول می کند. برخلاف سایر باسیلوس‌ها، باسیلوس‌آنتراسیس حساس به پنی‌سیلین است. درجدول ۳ به‌مهم‌ترین خصوصیات و تست‌های بیوشیمیائی که در افتراق باسیلوس‌آنتراسیس از سایر باسیلوس استفاده می‌شود، اشاره شده است. از تست‌های سرولوژی اغلب در مطالعات اپیدمیولوژی استفاده می‌شود. نمونه‌های سرمی مرحلهٔ حاد بیماری و مرحلهٔ نقاهت(۴–۲ هفته بعد از شروع بیماری) جهت بررسی آنتی‌بادی ضدکپسول و اندوتوکسین گرفته می‌شود.

کروماتوگرافی آنتی ژن‌های حفاظتی یک روش خیلی حساس، مناسب و معتبر برای جداسازی توکسین‌باسیلوس آنتراسیس در سرم افراد بیمار به‌شمار می‌رود. .روش ایمنومگنیتیک الکتروشیمیولومینس برای جداسازی آنتی‌ژن در غلظت کمتر از ۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر مناسب است. امروزه از PCR برای جداسازی ژن‌های ویرولانس روی پلاسمیدهای خاص استفاده می‌شود. لازم به‌ذکر است این تکنیک‌ها که در جداسازی و شناسایی باسیلوس آنتراسیس مفید هستند بیشتر در آزمایشگاه غیر از آزمایشگاه سطح A مورد استفاده قرار می‌گیرند.

فرانسیسلاتولارنسیس

تاکنون جایگاه فرانسیسلاتولارنسیس در طبقه‌بندی کاملاً مشخص نشده است. این گونه دارای دو بیووارتولارنسیس و پارالاکتیک می‌باشد. این باکتری هوازی اجباری، بدون حرکت، کپسول و اسپور می‌باشد. فرانسیسلاتولارنسیس کوکوباسیل کوچک(۰/۲ – ۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

میکرومتر) گرم منفی می‌باشد. این ارگانیسم از دیگر باکتری‌ها به‌دلیل اندازه کوچک، رنگ‌آمیزی دو قطبی با رنگ‌های آنیلینی، واکنش با آنتی‌بادی فلورنست، آگلوتیناسیون با آنتی سرم‌های خاص و فقدان رشد روی محیط‌های معمولی آزمایشگاه شناسائی می‌شود. برای رشد نیاز به اسیدآمینه سیستئین و سیستین دارد. کاتالاز مثبت ضعیف و اکسیداز و اورهٔآز منفی است. از محیط‌های مورد استفاده در آزمایشگاه می‌توان به SBA ـ شکلات آگار ـ تایرمارتین‌آگار، شکلات آگارغنی شده با سیستئین و ۹٪ خون(فیبرینه) و عصاره مخمر (BCYE) اشاره کرد.

رشد این باکتری کند ولی در محیط‌های مایع مانند تیوگلیکولات ـ تریپتیکاز سوی براث رشد آن سریع‌تر است. CO_2 رشد این باکتری را تحریک می‌کند. پلیت‌های کشت باید در ۳۷°C به‌مدت حداقل ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری شوند. بعد از ۱۸ ساعت انکوبه کلنی‌های نقطه‌ای ظاهر می شود. بعد از ۲ روز کلنی‌های صاف برآمده با اندازه ۱/۵–۱ میلی‌متر مشاهده می‌شود. بلافاصله محیط اطراف کلنی به‌طور مشخص سبز می‌شود.

انتقال فرانسیسلاتولارنسیس به انسان از طریق پوست، تنفس یا از طریق بلع می‌باشد. در حملات بیوتروریسمی انتقال تنفسی از طریق آئروسل از مهم‌ترین روش اصلی انتقال می‌باشد. با توجه به راه ورود باکتری به‌بدن علایم کلینیکی عفونت باکتری متفاوت می‌باشد.

جدول ۳- خصوصیات کلیدی در افتراق باسیلوس آنتراسیس از سایر گونه‌های باسیلوس

ویژگی	باسیلوس آنتراسیس	باسیلوس سرئوس و سایر گونه‌های باسیلوس
همولیز روی SBA	–	+
حرکت	–	+(معمولاً)
حساسیت به پنی‌سیلین	+	–
هیدرولیز ژلاتین(۷ روز)	–	+
تخمیراسکولین	–	+
هیدرولیز P ـ نیتروفنل ـ α ـ گلوکوزیداز در حضور۱٪ تریتون * ۱۰۰	+	–
رشد روی محیط فنیل اتیل الکل بلاد آگار	–	+

این باکتری از نظر بیوشیمیایی غیرفعال است. از این‌رو، تست‌های بیوشیمیایی ارزش تشخیصی ندارند. معمولاً تشخیص براساس یافته‌های کلینیکی، رنگ‌آمیزی گرم و رشد ضعیف روی SBA در درجهٔ حرارت اتاق می‌باشد. کشت‌های مشکوک به فرانسیسلا تولارنسیس باید به آزمایشگاه رفرانس ارسال شود. امروزه از روش‌های تشخیص مولکولی مانند PCR در آزمایشگاه‌های سطح ۳ مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بروسلا

گونه‌های بروسلاکوکوباسیل‌های کوچک و گرم منفی می‌باشند که به‌صورت تک زنجیره کوتاه یا جفت دیده می‌شوند. بدون حرکت، اسپور و هوازی اجباری می‌باشد. معمولاً اکسیداز و کاتالاز مثبت و اورهٔ آز متغیر است.

برای رشد نیاز به تیامین، نیاسین و بیوتین دارد. بعضی سویه‌های آن نیاز به سرم اضافی دارد. درجه حرارت اپتیمال برای رشد ۳۷ °c می‌باشد ولی بین ۱۰ °c تا ۴۰ °c رشد می‌کند. از بین گونه‌های بیماری‌زا در انسان گونه بروسلاملیتنسیس دارای بیشترین ویرولانس می‌باشد. بروسلا از سیستم رتیکلوواندوتلیال خون و مغز استخوان جدا می‌شود. خون و دیگر مایعات در محیط کاستاندا و در حضور ۱۰–۵ درصد CO_2 کشت داده می‌شوند. برای جداسازی بیشتر باید کشت ها را ساب کالچر داد. از محیط‌های SBA ، شکلات آگار، مکانکی آگار و BCYE برای کشت بروسلا استفاده می‌شود. اگر آلودگی نمونه بالا باشد می‌توان از محیط انتخابی مانند Farrell's یا تایرمارتین اصلاح شده استفاده کرد. همهٔ محیط‌های کشت در ۳۷°C–۳۵ در حضور ۱۰–۵ درصد CO_2 برای ۲۱ روز گرمخانه‌گذاری می‌شود. در ساب‌کالچر ۷ روز گرمخانه‌گذاری کافی می‌باشد. رشد بروسلا کند و کلنی‌های آن کوچک سفید محدب، ژلاتینی و بدون همولیز روی SBA می‌باشد. تشخیص احتمالی بروسلا براساس رنگ‌آمیزی گرم، عدم تخمیر گلوکز یا لاکتوز در سویه‌های غیرهمولتیک، اکسیداز و اوره آز مثبت می‌باشد. شناسایی قطعی گونه‌های بروسلا براساس نیازمندی به CO_2 ، تولید SH_2، حساسیت به فوشین ـ تیونین و آگلوتیناسیون با سرم تک‌ظرفیتی

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. آزمایشگاه‌های کلینیکی قادر به شناسایی قطعی گونه‌های بروسلا نیستند. لذا برای تشخیص قطعی نمونه‌ها باید به آزمایشگاه رفرانس ارسال گردد. لازم به‌ذکر است که تست‌های سرولوژی در تشخیص عفونت بروسلا مفید هستند.

یرسینیا پستیس

یرسینیاپستیس عامل بیماری طاعون در انسان می‌باشد که به ۳ فرم کلینیکی (خیارکی، پنومونیک و سپتی‌سمی) در انسان ظاهر می‌شود. این باکتری جزء خانوادهٔ انتروباکتریاسه می‌باشد. بنابراین باسیل گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. در اسمیر به‌شکل باسیل صاف، تکی یا زنجیره کوتاه که بعضی مواقع دوقطبی دیده می‌شود. همانند دیگر گونه‌های یرسینیا این باکتری از نظر بیوشیمیایی فعال نیست. این ارگانیسم سخت رشد می‌باشد. این باکتری بدون اسپور و حرکت می‌باشد. آسپیره غدد لنفاوی ـ بیوپسی طحال یا کبد که خون و نمونه‌های خلط را روی محیط SBA و مکانکی آگار و BHI آگار کشت می‌دهیم. درجهٔ حرارت اپتمال برای یرسینیاپستیس بین ۳۰ – ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. یرسینیاپستیس هنگامی‌که در ۳۷̊C کشت داده می‌شود، دارای Ag تنظیم‌کننده درجه حرارت(F1) می‌باشد که برای شناسایی آن استفاده می‌شود. روی محیط SBA به‌آرامی رشد می‌کند و کلنی آن روی این محیط مانند تخم‌مرغ نیم‌رو شده است. یرسینیاپستیس لاکتوز منفی بوده ودر محیط مایع به‌صورت بارش برف رشد می‌کند. Ag-F1 یرسینیاپستیس در نمونه‌های سرم از طریق روش ایمنوآسی شناسایی می‌شود. از روش‌های مولکولی مانند PCR (ژن مورد هدف ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن(Pla) می‌باشد) هم در تشخیص استفاده می‌شود.

کلستریدیم بوتولینوم

کلستریدیم بوتولینوم باسیل گرم مثبت، متحرک و اسپوردار می‌باشد که ۷ تیپ نوروتوکسین تولید می‌کند. در انسان این باکتری سبب بیماری بوتولیسم می‌شود که به‌چهار فرم کلینیکی (بوتولیسم ناشی از غذا یا بوتولیسم کلاسیک)، بوتولیسم زخم و بوتولیسم نوزادان و بوتولیسم با منشاء ناشناخته) دیده می‌شود. ممکن است در جنگ‌های بیولوژیک توکسین بوتولینوم را به‌صورت آئروسل یا در توزیع غذا مورد استفاده قرار بدهند. تنفس کردن همان علایم را ایجاد می‌کند که در اثر خوردن به‌وجود می‌آید. عموماً آزمایشگاه‌های بالینی قادر به‌شناسایی کلستریدیم بوتولینوم و توکسین آن نیستند. تلقیح به موش به‌طور کلاسیک برای جداسازی و حضور سم در مدفوع، استفراغ ، شیرهٔ معده و سرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. از روش مولکولی مانند انواع PCR برای شناسایی توکسین‌ها در آزمایشگاه‌ها استفاده شده است. نمونه‌های کلستریدیم بوتولینوم را کشت می‌دهند ولی بعد از رشد باید توکسیژنیسیته آن را بررسی کرد. سیستم‌های شناسایی تجارتی خیلی معتبر نیستند.

آبله

واریولا توسط ویروس DNAدار دو رشته‌ای که متعلق به‌جنس اورتوپاکس ویروس می‌باشد در انسان به‌وجود می‌آید. انتقال آن از طریق آئروسل، ترشحات اورفارنکس ، تماس مستقیم یا از طریق اجسام آلوده صورت می‌گیرد.

تشخیص تأئیدی آبله در آزمایشگاه با امکانات بالا (BSl-4) انجام می‌شود. نمونه‌های بالینی حاوی ویروس آبله در درجهٔ حرارت اتاق برای یک سال یا در ۴۰̊C برای چندین ماه و در ۲۰̊C- تا ۷۰̊C- برای سال‌ها زنده باقی می‌ماند. این ویروس از مایعات وزیکولی و پوستولی ضایعات افراد جدا می‌شود. از نمونه‌های اتوپسی شش، کبد، طحال و کلیه درتشخیص استفاده می‌کنند. تشخیص توسط میکروسکوپ الکترونی خیلی معتبر است و عموماً استفاده می‌شود. اجسام گارنری که رسوبات ائوزینوفیلی روی ذره ویروس می‌باشد در اسمیر رنگ‌آمیزی شده با گیمسا زیر میکروسکپ نوری قابل بررسی می‌باشد. کشت روی ردهٔ سلولی انسان اغلب برای جداسازی ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویروس آبله بعد از ۳-۱ روز گرمخانه‌گذاری اثر سیتوپاتیک از خود نشان می دهد. روی غشای کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار ایجاد ضایعه پاک(Pock) می‌کند Ag سلول ویروس را می‌توان از طریق فیکساسیون کمپلمان ایمنوفلورسانس یا تکنیک اشترلونی جدا کرد. همچنین تشخیص از طریق فیکساسیون کمپلمان و بازدارندگی از گلوتیناسیون HI انجام می‌گیرد. تشخیص قطعی از

www.SID.ir

Archive of SID

طریق PCR و RLP(Restriction Length Polymorphism) انجام می‌شود.

تب‌های هموراژیک ویروسی

سندرم تب هموراژیک ویروسی توسط چندین ویروس RNAدار شامل فیلوویریده، آرناویریده، بونیا ویریده و فلاوی ویریده به‌وجود می‌آید. این ویروس‌ها دارای قدرت عفونت‌زایی بالایی از طریق آئروسل هستند. تنها آزمایشگاه‌های با امکانات Bsl-4 قدرت جداسازی و تشخیص این عوامل را دارند. از کشت، تست‌های سرولوژی کلینیک‌های ایمنوهیستوشیمیایی و روش‌های آمپلی‌کاسیون برای تشخیص این عوامل استفاده می‌شود. برای جداسازی از خون، مایع مغزی نخاعی یا دیگر بافت‌ها نمونه استفاده می‌شود. خون هپارینه شده یا لخته‌های هموژنیزه شده برای جداسازی ویروسی مفید است.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از جنگ‌افزارهای بیولوژیک به‌دلیل، تولید و پخش آسان، ارزان بودن و پایداری بالا نسبت به‌عوامل شیمیایی و هسته‌ای بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از این‌رو، آزمایشگاه‌های بالینی که در ارتباط با نمونه‌های کلینیکی درخصوص بیماری ایجاد شده توسط عوامل بیولوژیک هستند باید از نظر امکانات و تجهیزات و تست‌های تشخیصی در حد بالا باشند. همچنین پرسنل آزمایشگاه باید اطلاعات خود را در این زمینه بالا برده تا از مخاطرات احتمالی که آنها را در هنگام کار یا این عوامل در آزمایشگاه تهدید می‌کند، در امان باشند. آزمایشگاه بالینی از نظر سطوح ایمنی زیستی به ۴ گروه تقسیم می‌شوند که هرگروه دارای تجهیزات و امکانات خاص خود می‌باشند. هر کدام از این سطوح برای کار با میکروارگانیسم‌های خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد. مثلاً کار روی عوامل باکتریال باید حداقل در آزمایشگاه‌های با امکانات ایمنی‌زیستی سطح ۲ انجام گیرد یا مطالعه عوامل ویروسی باید در سطوح Bsl-4 انجام گیرد. امروزه به‌دلیل این‌که احتمال استفاده از جنگ‌افزارهای بیولوژیک توسط کشورهای جهان بالا رفته است. باید آزمایشگاه‌های کلینیکی سطح ایمنی‌زیستی خود را بالا برده و در این خصوص به‌پرسنل خود در زمینهٔ عوامل بیولوژیک و کار با آنها را آموزش دهند. همچنین رؤسای آزمایشگاه به‌عنوان مسئول پاسخگویی به تهدیدات بیوتروریسمی باید همیشه از توان خود از تمام جهات در زمینهٔ تشخیص و جداسازی عوامل بیولوژیک آگاه بوده و آمادگی خود را در پاسخ به این تهدیدات حفظ کنند.

برگرفته از:

Nulens E and Voss A(2002). Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents, Clinical Microbiology & Infection; 8(8): 455- 466.

www.SID.ir