**مدیریت نمونه در آزمایشگاه**

مقدمه

نتايج آزمايش­ها تحت تاثير متغيرهای گوناگونی است که شناسايی آن­ها و بدنبال آن استاندارد نمودن روش­های آزمايشگاهی جهت تفسير و استفاده بهينه از داده­های آزمايشگاهی ضروری است. اين متغيرها شامل مراحل قبل از، حين و پس از آزمايش می­باشند. در سال­های اخير با توجه به تاکيد بر اجرای روش­های کنترل کيفی در کليه بخش­های آزمايشگاه در مرحله حين آزمايش و   
به­دنبال آن برگزاری دوره­های آموزشی در اين خصوص، خطاهای حين آزمايش به حداقل رسيده است و لذا تاثير متغيرهای قبل و بعد از آزمايش بسيار پررنگ شده است.

بـا تـوجـه بـه اهميت متغيرهـای قبل از آزمـايش در ايـن فصـل سعـی شـده است مجموعـه­ای از دستورالعمل­هــای کـاربردی در خصـوص مـديـريت نـمـونه بيـان گردد که اين موارد شامل: نحوه   
جمع­آوری انواع نمونه­های بالینی، شامل خون و ساير مايعات بدن، آماده­سازی نمونه، جابجايی و نقل انتقال نمونه، شرايط نگه­داری و موارد رد نمونه می­باشد.

بديهی است رعايت موارد ذکر شده در اين مجموعه در به حداقل رساندن عواملی که می­تواند نتايج آزمايش را تحت تاثير قرار دهد، کمک شايانی خواهد نمود.

# تجهيزات لازم جهت اتاق نمونه‌برداري

نمونه‌گيري بايد در يك محل مجزا، تميز و ساكت صورت گيرد. اين اتاق بهتر است مجهز به دستشويي بوده و در صورت عدم دسترسي به آب، بايد محلول‌هاي تميزكننده دست‌ موجود باشد.

1- صندلي نمونه‌برداري: بايد داراي دسته قابل تنظيم باشد به­طوري كه بيمار بتواند در راحت‌ترين وضعيت جهت نمونه‌گيري روي صندلي بنشيند. هم­چنين صندلی بايد داراي حفاظ ايمني جهت جلوگيري از افتادن بيمار باشد.

2- تخت معاينه

3- سيني جمع‌آوري ظرف­های نمونه

4- دستكش

• *دستکش در صورت آلودگي و يا در فواصل نمونه­گيري­ها بايد تعويض گردد.*

5- سوزن (19–23G)

6- سرنگ يا نگه‌دارنده مخصوص (holder) جهت استفاده از لوله‌هاي خلاء (evacuated tube)

7- نیشتر يك­بار مصرف

8- انواع لوله‌ها و ظروف در پيچ‌دار يا لوله‌هاي خلاء

9- بازوبند (tourniquet)

10- يخچال يا يخ بايد در دسترس باشد

11- ضدعفوني كننده‌ها:

•• ايزوپروپيل الكل يا اتيل الكل 70%

•• محلول povidone – iodine 10-1% يا كلر هگزيدين گلوكونات جهت كشت خون

12- گاز پارچه‌اي در ابعاد cm 5×5 يا cm 5/7×5/7 (استفاده از پنبه پيشنهاد نمي‌­گردد). باند و گاز بايد جهت پانسمان در دسترس باشد.

13- ظروف مخصوص دفع سرسوزن­هاي آلوده (Puncture Resistant Disposal Container)

15- فهرست انواع آزمايش‌ها و درج مقدار خون لازم براي هر آزمايش و نوع لوله مورد استفاده

16- روتاتور جهت مخلوط نمودن لوله­هاي محتوي خون

**نمونه­گيري وريدي**

# مراحل نمونه‌گيري

خون‌گيري صحيح نياز به دانش و مهارت توام دارد. جهت جمع‌آوري نمونه‌ خون وريدي، خون‌گير كار آزموده بايد مراحل زير را پي‌گيري نمايد:

1- انطباق مشخصات برگه درخواست آزمايش با مشخصات بيمار

2- اطمينان از رعايت رژيم غذايي پيش از نمونه­گيري

3- انتخاب وسايل مورد نياز

سرنگ و سرسوزن مناسب يا لوله خلاء براساس نوع آزمايش انتخاب می­شود.

***\* به­طور كلي توصيه مي­گردد به­دليل رعايت اصول ايمني از سرنگ و سرسوزن استفاده نشود و لوله‌هاي خلاء جايگزين آن گردند.***

4- استفاده از دستکش

5- وضعيت بيمار هنگام نمونه­گيري

بيمار بر روي صندلي نمونه‌گيري نشسته و دست خود را به منظور برجسته شدن وريدها مشت کرده و به نحوی روی دسته صندلی نمونه­برداری قرار می­دهد که بازو تا مچ دست در يك خط مستقيم قرار گيرند. بايد توجه داشت كه بيمار نبايد مشت خود را باز و بسته نمايد زيرا باز و بسته کردن مشت باعث تغيير بعضي مواد در خون مي‌شود.

6-بستن تورنيکه

به منظور افزايش پر شدن وريد از خون و برجسته شدن رگ مورد نظر و جهت تسهيل ورود خون به­داخل سرنگ يا لوله‌هاي خلاء از رگ­بند (تورنيكه) استفاده مي‌شود (قابل ذکر است در مواردي نظير اندازه­گيري لاکتات خون نبايد تورنيکه بسته شود).

***رگ­بند بايد10-5/7 سانتي‌متر بالاي ناحيه نمونه‌گيري بسته شود و نبايد بيش از يك دقيقه بر روي بازوي بيمار بسته بماند***.

7- انتخاب وريد مناسب

در اغلب موارد نمونه­گيري از وريدهاي Median cubital و Cephalic صورت مي‌گيرد. خون­گيری از وريدهاي پشت دست نيز قابل قبول است، ولي وريدهاي سطح داخلي مچ نبايد مورد استفاده قرار گيرند.

8- تميزكردن محل نمونه‌گيري

ناحيه نمونه‌گيري به كمك گاز آغشته به ايزوپروپيل الكل يا اتيل الكل70% به­صورت حركت دوراني از داخل به خارج تميز مي‌شود. نمونه­گیری پس از خشك شدن موضع در هوا، به­منظور جلوگيري از هموليز و کاهش سوزش ناشي از تماس نوك سوزن با الكل و پوست، صورت مي­گيرد.

9**-** نمونه­گيري

باید سر سوزن در حالي كه قسمت مورب نوك آن به سمت بالا است، با زاويه °C30 يا كمتر وارد وريد شود.

***\* به محض ورود خون بداخل سرنگ يا لوله خلاء بايد رگ­بند (تورنیکه) باز شود.***

در صورت استفاده از لوله خلاء بايد تمهيدات زير صورت گيرد :

•• حتي‌الامكان سوزن در رگ ثابت نگه­داشته شده و اولين لوله با فشار به سوزن مرتبط شود.

•• لـولـه‌ها بايد تا خاتمه مكش از خون پر شوند. پس از وقفه جريان خون اولين لوله از سوزن جدا شده و لوله‌هاي بعدي به سوزن متصل مي‌شوند.

•• لوله‌هاي حاوي ماده ضد انعقاد و خون بايد بلافاصله پس از پرشدن مخلوط شوند (با10-5 مرتبه سروته نمودن). جهت جلوگيري از هموليز نبايد لوله­ها به شدت مخلوط گردند.

***پس از جاري شدن روان خون به داخل سرنگ يا لوله‌هاي خلاء بيمار باید مشت خود را باز کند****.*

10- دفع سر سوزن

سر سوزن­هاي آلوده ***بدون گذاشتن درپوش سرسوزن*** بايد در ظروف ايمن، دفع گردند. سپس نمونه خون به آرامي در ظروف مربوطه تخليه شود.

11- تخليه خون

نمونه‌هايي كه در لوله‌هاي حاوي ماده ضد انعقاد ريخته مي‌شوند بايد بلافاصله و به آرامي 5 تا 10 بار مخلوط شوند. در صورتي­كه نمونه در لوله بدون ماده ضد انعقاد ريخته مي‌شود بايد به آرامي در جدار داخلي لوله تخليه گردد.

12- اقدامات پس از نمونه­گيري

پس از خاتمه نمونه‌گيري، بايد موضع از نظر بندآمدن خون‌ريزي و يا به­وجود آمدن هماتوم كنترل گردد.

13- برچسب­گذاري ظرف حاوی نمونه

***بلافاصله پس از اتمام نمونه‌گيري بايد برچسب دارای اطلاعات زير را بر روي لوله‌ها و ظروف حاوي نمونه خون بيمار الصاق نمود:***

***- نام، نام خانوادگي بيمار، شماره شناسايي، تاريخ، زمان نمونه­گيري (بخصوص در آزمايش­های رديابي دوز درماني داروها TDM)، نام فرد خون‌گير***

**خون­گيری مويرگي – نمونه­گيري از طريق سوراخ كردن پوست**

**(Skin Puncture)**

خون­گيری مويرگی در نوزادان، اطفــال و بزرگسالان در شرايط خاص نظير بيماران با سوختگي وسيع، بيماران بسيار چاق، بيماران مستعد به ترومبوز و بيماران مسن يا ساير بيماراني که وريدهاي سطحي آن­ها قابل دسترسي نبوده يا بسيار شکننده است، از اهميت ويژه­اي برخوردار است.

**• نواحي مناسب جهت سوراخ کردن پوست و جمع­آوري نمونه:**

- بند انتهايي انگشتان دست

- سطح داخلي و خارجي پاشنه پا

* ***در نوزادن کمتر از يک­سال معمولا خون­گيري از پاشنه پا انجام مي­گيرد.***
* ***در اطفال و بـزرگسـالان معمولا از سطـح داخـلی بند آخـر انگشتان (انگشت سـوم يـا چهـارم) خون­گيري صورت مي­گيرد. سطح جانبي و نوک انگشتان مناسب نمی­باشند.***

از نواحي زير *نبايد* خون­گيري صورت گيرد:

1. نرمه گوش
2. ناحيه مرکزي پاشنه پا در نوزادان
3. انگشتان (دست و پا) نوزادان و اطفال کمتر از يک­سال
4. نواحي متورم يا مناطقي که قبلا جهت نمونه­گيری سوراخ شده­اند(به­دليل تجمع مايع بافتي)

**• روش کار**

موضع مورد نظر توسط محلول ايزوپروپانول 70% (يا اتانول70%) ضد عفوني شده و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، خون­گيري به­وسيله لانست استريل انجام مي­شود. قابل ذکر است که باید اولين قطره خون را به­وسيله گاز پاک کرده و از قطرات بعدي استفاده نمود.

**آماده­سازي نمونه خون**

سرم يا پلاسما بايد در کوتاه­ترين زمان به­دنبال نمونه­گيري از سلول­هاي خوني جدا گردد. حداکثر زمان مجاز جهت جداسازي سرم يا پلاسما 2 ساعت پس از نمونه­گيري پيشنهاد مي­گردد. قابل ذکر است که درخصوص اندازه­گيري ترکيباتي نظير پتاسيم، هورمون­هاي کورتيکواستروئيدي، کورتيزول، کاتکولامين­ها، اسيد لاکتيک و هموسيستين اين زمان بايد کمتر از 2 ساعت باشد.

قابل ذکر است که درجه حرارت محيط نيز بر پايداري برخي مواد تاثير مي­گذارد.

آماده­سازي نمونه در طي سه مرحله انجام می­گيرد: مرحله پيش از سانتريفیوژ، مرحله سانتريفیوژ، مرحله پس از سانتريفیوژ

**• مرحله پيش از سانتريفیوژ**

براي اکثر روش­هاي اندازه­گيري مواد در خون به­جز اندازه­گيري گازهاي خون و آمونياک، استفاده از سرم يا پلاسما ارجحيت دارد.

**•• تهيه سرم:** نمونه خون پس از جمع­آوري (در ظروف در بسته)، بايد جهت جداسازي و سانتريفیوژ مراحل لخته شدن را طي نمايد که بهتر است اين مرحله با طي زمان و به­طور خودبخود صورت گـيرد. عمـل لخته شدن به­طور طبيعي در دماي اتاق (°C25-22) پس از 60-30 دقيقه کامل مي­گردد. در صورتي که بيمار داروهاي ضد انعقاد مصرف نمايد، زمان لخته شدن طولاني­تر بوده و اگر نمونه در شرايط سرما قرار گيرد (°C8-2) نيز اين عمل به تاخير مي­افتد. هم­چنین اگر زمان لازم جهت کامل شدن مراحل تشکيل لخته کافي نباشد، تشکيل رشته­هاي ظريف فيبرين ممکن است سبب ايجاد خطا در نتايج بسياري از دستگاه­های خودکار بیوشیمی گردد. جهت تسريع در عمل لخته شدن مي­توان از لوله­هاي جمع­آوري سرم که حاوي فعال­کننده يا تسريع­کننده عمل لخته شدن باشد استفاده نمود. به­طور مثال لوله­هاي حاوي افزودني نظير سم مار، زمان تشکيل لخته را به 5-2 دقيقه، ترومبين به 5 دقيقه، سیليکا و پارتيکل­هاي شيشه به حدود 30-15دقيقه مي­رسانند. (استفاده از اپليکاتور چوبي يا پلاستيکي جهت جداسازي لخته از ديواره لوله پيشنهاد نمي­گردد)

**•• تهيه پلاسما:** لـولـه­هـاي حاوي خون به همراه مواد افزودني به­جز سيترات سديم بايد پس از نمونه­گيري به آرامي براي حداقل 10-5 بار جهت مخلوط شدن سر و ته گردند (به­جز موارد خاص کـه بايـد مطابق دستورالعمل سازنده لوله عمل گردد). لوله­هاي حاوي سيترات سديم و خون بايد 4-3 مرتبه سر و ته گردند.

**•• سرد نمودن:** بعضي نمونه­ها بايد تا قبل از عمل سانتريفیوژ و جداسازي در سرما نگه­داري شوند. سرد کردن نمونه، متابوليسم سلول­هاي خوني را مهار نموده و سبب پايداري اجزاي حساس به حرارت مي­گردد. جهت سرد نمودن، نمونه بايد سريعا در يخ خرد شده يا مخلوطي از آب و يخ قرار گيرد (استفاده از تکه­هاي بزرگ يخ به­دليل تماس ناکافي بين نمونه و يخ قابل قبول نمی­باشد). يخ بايد کاملا اطراف سطح خون درون لوله را احاطه کند.

***نکته: قرار دادن نمونه خون بيش از دو ساعت در سرما سبب افزايش کاذب پتاسيم مي­گردد. سرما سبب مهار گليکوليز شده، لذا انرژي جهت پمپ پتاسيم به داخل سلول ايجاد نمي­گردد و بدنبال آن پتاسيم از سلول­ها به بيرون نشت مي­کند. نمونه جهت اندازه­گيري الکتروليت­ها نيز نبايد تا قبل از سانتريفیوژ و انجام آزمايش در دماي °C8-2 قرار گيرد.***

نمونه خـون جهت انـدازه­گيري تـرکيباتـي نظير کـاتکول آمين­ها، آمونياک، اسيد لاکتيک، پيروات، گاسترين، هورمون پاراتيروئيد، فعاليت رنين پلاسما و اسيد فسفاتاز، بايد پس از جمع­آوري در سرما نگه­داري شود.

**•• نگه­دارنده­ها و مهارکننده­هاي متابوليک:** بعضي افزودني­ها مي­توانند از تغييرات غلظت مواد در نمونه با گذشت زمان جلوگيري نمايند. مواد آنتي گليکوليتيک نظير فلورايد مي­توانند گلوگز را در حضور سلول­هاي خوني به مدت 24 ساعت در دماي اتاق (°C24-22) و تا 48 ساعت در دماي يخچال (°C8-2) پايدار نگه­دارند. به­دليل حساسيت اندازه­گيري گلوگز در نوزادان و اطفال مي­توان از مواد افزودني آنتي گليکوليتيک استفاده نمود. هم­چنين جهت اندازه­گيري لاکتات بايد از فلورايد سديم يا اگزالات پتاسيم استفاده نمود.

**انتقال**

انتقال نمونه­هاي بيولوژيک نظير خون، ادرار و ساير مايعات بدن از محل نمونه­گيري به آزمايشگاه جزء مهمي از چرخه­کاري در آزمايشگاه مي­باشد. در مورد نمونه­هاي خون روند انتقال 3/1 زمان چرخه کاري را شامل مي­شود.

**\* جمع­آوري نمونه در محل آزمايشگاه**

**•• زمان:** نمونه­ها بايد در ظروف در بسته مناسب در کوتاه­ترين زمان ممکن به آزمايشگاه ارسال گردند. انتقال نمونه­ها می­بايست در شرايط دماي اتاق صورت گيرد، به­جز نمونه­هايي که بايد با حفظ زنجيره سرد نگه­داري و منتقل شوند. انتقال سريع نمونه از محل نمونه­گيري به آزمايشگاه در شرايطي که دماي محل نمونه­گيري بالاتر از °C22 است از اهميت زيادي برخوردار است.

**•• وضعيت لوله:** نمونه­هاي خون بايد در لوله­هاي در پوش­دار و در وضعيت قائم نگه­داري گردند. اين امر سبب تسريع فرايند انعقاد و هم­چنين کاهش به هم خوردگي محتوي لوله مي­گردد و احتمال ايجاد هموليز را نيزکاهش مي­دهد.

**•• درپوش:** نمونه­ها بايد در طول مدت انتقال و نگه­داري در ظروف درپوش­دار قرار گيرند. عدم وجود درپوش باعث خطا در نتايج بعضي متغيرها به­دليل از دست دادن دي اکسيد کربن و افزايش PH نظير کلسيم يونيزه و اسيد فسفاتاز (افزايش مي­يابند) مي­گردد.

هم­چنين وجود درپوش خطر ايجاد آئروسل، تبخير نمونه و آلودگي را نيز کاهش مي­دهد.

**•• هموليز:** حمل و نقل نمونه بايد به آرامي صورت گيرد تا امکان آسيب به گلبول­های قرمز را به حداقل رساند. وجود هموليز در نمونه سبب تداخل با عملکرد برخي دستگاه­هايي می­شود که به روش نوري پارامترها را اندازه­گيري مي­کنند. ترکيبات زيادي در سرم و پلاسما تحت تاثير هموليز (با منشا خارجي) قرار مي­گيرند که نمونه­هايي از آن به شرح زير است:

* پارامترهايي که شديدا تحت تاثير هموليز قرار گرفته و افزايش مي­يابند شامل: هموگلوبين پلاسما، آسپارژين امينو ترانسفراز (AST)، پتاسيم، لاکتات دهيدروژناز می­باشند.
* پارامترهايي که به­طور قابل توجهي تحت تاثير هموليز قرار مي­گيرند شامل: آهن، آلانين امينو ترانسفراز (افزايش مي­يابند) و T4 (کاهش مي­يابد) هستند.
* پارامترهايي که کمتر تحت تاثير هموليز قرار گرفته ولی امکان افزايش آن­ها به­دنبال هموليز وجود دارد شامل: فسفر، پروتئين توتال، آلبومين، منيزيم، کلسيم، و اسيد فسفاتاز می­باشند.

قابل ذکر است پلاسماي حاوي 20 ميلي­گرم در دسي­ليتر هموگلوبين، به رنگ صورتي روشن و پلاسمای حاوی 100 ميلي­گرم در دسي­ليتر هموگلوبين، به رنگ قرمز است. بالا رفتن بيلي­روبين در پلاسما ممکن است وجود هموگلوبين را بپوشاند به­طور مثال غلظت 200 ميلي­گرم در دسي­ليتر هموگلوبين ممکن است با چشم غير مسلح با وجود بيلي­روبين 20 ميلي­گرم در دسي­ليتر قابل رویت نباشد.

وجود هموليز در نمونه خون کامل ممکن است با چشم قابل رويت نباشد لذا پيشنهاد مي­گردد در مواردي که نتايج متغير مورد اندازه­گيري بالاتر از محدوده مرجع آن مي­باشد، نمونه مورد آزمايش از نظر وجود هموليز نيز بررسي گردد. (با سانتريفیوژ و بررسي پلاسما)

**•• مجاورت با نور:** نمونه نبايد در مقابل نور خورشيد قرار گيرد اين امر بخصوص در مورد ترکيباتي که به نور خورشيد يا اولترا ويوله بسيار حساس هستند نظير بيلي­روبين، ويتامين A و B6 و بتا کاروتن بسيار اهميت دارد. ظرف حاوی اين نمونه­ها جهت محافظت از نور بايد در پوششي از کاغذ آلومنييوم پيچيده شده يا درظرف شيشه­اي قهوه­اي نگه­داری شوند.

**\* جمع­آوري نمونه خارج از محل آزمايشگاه**

در صورتي که در مرکزي فقط نمونه­گيري انجام گيرد، نمونه­هاي خون بايد حداکثر تا دو ساعت پس از نمونه­گيري با رعايت تمهيدات لازم نظير شرايط پايداري متغيرهاي مورد آزمايش و رعايت اصول ايمني، در دماي اتاق (مگر در موارد خاص که نياز به زنجيره سرد دارد) به آزمايشگاه منتقل شوند. در صورتي که نتوان در محدوده زماني فوق، نمونه خون را ارسال نمود بايد پس از جداسازي سرم و پلاسما، آن را دردماي °C8-2 نگه­داري و با رعايت پايداري نمونه به آزمايشگاه ارسال کرد.

**\* دريافت نمونه**

نمونه خون پس از دريافت و کامل شدن مرحله لخته، جهت سانتريفیوژ آماده مي­گردد. در صورتي کـه خـون در لـولـه فعـال­کننـده لختـه جمـع­آوري شـده بـاشد در طي مدت 30-5 دقيقه پس از   
نمونه­گيري مي­تواند سانتريفیوژ گردد. نمونه در لوله حاوي ماده ضد انعقاد سريعا قابل سانتريفیوژ مي­باشد.

جهت اندازه­گيري بعضي متغيرها در خون نظير سرب، سيکلوسپورين و هموگلوبين گليکوزيله، خون کامل مورد استفاده قرار مي­گيرد. ولي اگر نمونه اشتباها سانتريفیوژ شود مشکلي ايجاد نشده و   
می­توان آن را با همان شرايط به بخش مربوطه ارسال نمود.

نمونه­هايی که بايد در شرايط سرما نگه­داری شوند (°C8-2) تا آماده شدن جهت سانتريفیوژ بايد در این درجه حرارت باقی بمانند. سانتريفیوژ يخچال­دار در اين خصوص پيشنهاد می­گردد.

**\* معيارهاي رد نمونه خون**

•• مشخصات ناکافي از بيمار يا نوع آزمايش (نظير عدم وجود برچسب يا برچسب با اطلاعات ناقص)

•• حجم ناکافي

•• نشت نمونه به خارج از ظرف

•• استفاده از لوله نامناسب جمع­آوري نمونه

•• ضد انعقاد نامناسب (مثلا فلورايد سديم در اندازه­گيري اوره با روش اوره­آز تداخل مي­کند)

•• ترتيب نادرست جمع­آوري نمونه در صورتي که در طی يک بار نمونه­گيری از لوله­هاي متعدد خلاء استفاده شود.

•• وجود هموليز يا ليپمي

•• نگه­داري و انتقال نمونه در دمای نامناسب

•• وجود لخته در نمونه­هاي جمع­آوري شده با ماده ضد انعقاد

•• عدم تطابق برگه درخواست آزمايش با نوع نمونه و مشخصات آن

•**مرحله سانتريفیوژ**

همان­طور که ذکر شد استفاده از اپليکاتور چوبي يا پلاستيکي جهت جداسازي لخته از ديواره لوله پيشنهاد نمي­گردد. در صورت استفاده بايد احتياط لازم برای جلوگیری از ايجاد هموليز و توليد آئروسل صورت گيرد. هم­چنين بايد در تمام مراحل جداسازی نمونه، رعايت اصول ايمني و استفاده از وسايل حفاظت فردي صورت گيرد. قابل ذکر است که درب لوله­ها در طی سانتريفیوژ حتما بايد بسته باشد.

امروزه با تنوع سانتريفیوژها از نظر قسمت گردان ((Rotor، سر (Head)، شعاع موثر و قطر داخلي ديگر از اصطلاح(Round Per Minute) استفاده نمي­شود و نيروي نسبي سانتريفیوژ (Relative Centrifugal Force) یا RCF جايگزين آن شده است.

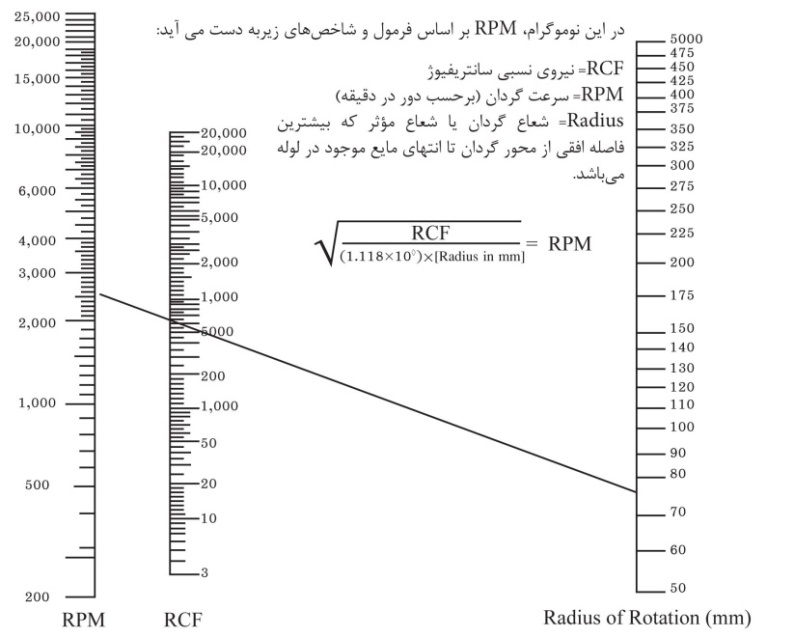
RCF= 1.118×10 5×r×(RPM)2

r : شعاع گردان (سانتي متر)

شعاع موثر بيشترين فاصله افقي از محور گردان تا انتهاي مايع موجود در لوله مي­باشد.

RPM : سرعت گردان (تعداد دور در دقیقه)

برای تعیین RPM مورد نیاز با توجه به شعاع و نیروی نسبی سانتریفیوژ می­توان از نمودار 1-3 بهره گرفت .



**نمودار 1-3: نموگرام تعیین RPM به کمک شعاع و نیروی نسبی سانتریفیوژ**

**برای مطالعه بیشتر به دستورالعمل فنی سانتریفیوژ در کتاب مدیریت و کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه پزشکی از این مولف مراجعه شود.**

قـابـل ذکـر است جهت برخي فاکتورها که به دما حساس هستند، بايد از سانتريفیوژهايي­کـه دماي آن­ها قـابل کنترل است استفاده نمـود. بـه­طور مثال تـرکيباتی نظير ACTH و cAMP به گرما حساس هستند و انتقال و سانتريفیوز آن­ها نيز بايد در دماي °C4 صورت گيرد.

***نکته: در صورتي­که اندازه­گيری پتاسيم هم به همراه ترکيباتي که حساس به دما هستند درخواست شده باشد بايد توجه نمود که نمونه مذکور سريعا از سانتريفیوژ خارج شود (دماي پايين­تر از °C15 سبب افزايش کاذب پتاسيم پس از 2 ساعت مي­گردد). لازم به ذکر است جهت اندازه­گيري پتاسيم نمونه نبايد بيش از يک­بار سانتريفیوژ گردد.***

**\* زمان مورد نياز جهت سانتريفیوژ نمونه**

* **تهيه سرم و پلاسما:** نمونه در ظرف درپوش­دار بايد بـه مـدت 15-10دقيقه در g1200-1000 سانتريفیوژ شود. در صـورتـی­کـه آزمـایش تا 4 ساعـت بعـد از جداسازی سرم انجام نگیرد، سرم يا پلاسما بايد در دماي °C6-4 نگه­داري گردد.
* **تهيه پلاسما جهت آزمون­هاي انعقادي:** نمونه در ظرف درپوش­دار بايد به مدت 15دقيقه در g1500 سانتريفیوژ گردد.

• **مرحله پس از سانتريفیوژ**

* **نگه­داري نمونه**

پلاسما و سرم حداکثر تا 8 ساعت پس از جداسازي در دماي اتاق قابل نگه­داري است. در صورتي­که سنجش مورد نظر تا 8 ساعت صورت نگيرد نمونه بايد در يخچال نگه­داري گردد.

درصورتي­که امکان انجام آزمايش تا 48 ساعت مقدور نباشد يا در صورت نياز به نگه­داري طولاني­تر، سرم يا پلاسما بايد در دماي °C20- نگه­داري شود.

***نکته: باید از آب شدن و يخ زدن مکرر نمونه­هاي فريز شده جدا پرهيز گردد، زيرا اين امر سبب از بين رفتن بعضي ترکيبات در سرم يا پلاسما مي­شود. استفاده از فريزرهاي بدون برفک نيز جهت نگه­داري نمونه پيشنهاد نمي­گردد.***

در صورت استفاده از مواد آنتي گليگوليتيک (نظير فلورايد) گلوگز پلاسما تا 24 ساعت در دماي °C25 و تا 48 ساعت در دماي °C8-2 پايدار مي­ماند. (حتي در صورت عدم جداسازي پلاسما از سلول­ها) قابل ذکر است در صورتي­که گلبول­های قرمز، پلاکت و گلبول­های سفيد نمونه بالاتر از حد طبيعي باشند، اثر گليکوليتيک اين مواد کاهش مي­يابد. به­دليل مشکل بودن مهار گليکوليز در نوزادان، باید پلاسما در اسرع وقت از سلول­ها جدا گردد.

* در صورت استفاده از لوله­هاي جمع­آوري خلاء داراي ژل جداکننده همراه با افزودني يا فعال کننده لخته، بايد ملاحظات زير صورت گيرد:

•• به محض جمع­آوري خون جهت سرعت بخشيدن، تکميل عمل لخته شدن و روند ضد انعقاد، لوله­ها بايد10-5 بار تکان داده شوند.

•• نيروي نسبي سانتريفیوژ و زمان لازم جهت جداسازی سرم يا پلاسما بسته به کارخانه سازنده ممکن است متفاوت باشد.

•• به­طور کلي می­توان سرم را در لوله­هاي محتوي ژل تا 48 ساعت در دماي °C4 نگه­داري نمود، ولي بايد قوام ژل به­طور چشمي نيز بررسي گردد.

***تداخلات:***

***از لوله­هاي جمع­آوري خون حاوي ژل جداکننده جهت اندازه­گيري ميزان پروژسترون، داروهاي سه   
حلقه­اي ضدافسردگي، اندازه­گيري سطح دارويي و آزمون­هاي ايمونوهماتولوژي (بانک خون) نبايد استفاده شود.***

**اسمير خون محيطي**

تهيه گستره خون محيطي بايد توسط کارکنان آموزش ديده صورت گيرد. تهیه گستره با استفاده از نمونه تهيه شده از نوک انگشت، پاشنه پا يا نمونه همراه با ماده ضد انعقاد EDTA صورت می­گيرد. در صورت استفاده از نمونه همراه با ماده ضد انعقاد، بايد گسترش خون محيطي حداکثر تا يک ساعت پس از نمونه گيري تهيه گردد.

**• گسترش ضخيم**

1. بند اول انگشت سوم يا چهارم در بزرگسالان و يا پاشنه پا در نوزادان (مراجعه به نمونه­گيري مويرگي) ضد عفوني شده و با لانست يک­بار مصرف موضع سوراخ مي­گردد.
2. يک يا دو قطره خون را با مرکز لام مماس می­کنیم، بايد توجه شود که لام با پوست تماس پيدا نکند.
3. با گوشه يک لام ديگر يا اپليکاتور قطره خون را به­طور يکنواخت پخش کرده تا دايره­ای به قطر حدود 1سانتي­متر ايجاد شود. گسترش بايد به سرعت و با ضخامت يکنواخت تهيه گردد.
4. لام را در وضعيت افقي قرار داده تا در حرارت محيط (°C25) خشک شود. براي تسريع در عمل خشک شدن نبايد از شعله يا منبع ديگر حرارتي استفاده نمود.

***نکته:***

***•• ضخامت گسترش بايد به گونه­اي باشد که نوشته­هاي روزنامه از زير آن به سختي خوانده شود.***

***•• گسترش ضخيم نبايد به­وسيله مواد تثبيت­کننده ثابت گردد.***

***•• گسترش ضخيم ممکن است از بافي کوت نيز تهيه گردد (با استفاده از نمونه خون در ماده ضد انعقاد)***

**• گسترش نازک**

1- يک قطره خون (حدود 05/0 ميلي­ليتر) به فاصله حدود 2 سانتي­متر از انتهاي لام قرار داده شود. بايد توجه شود که لام با پوست دست بيمار تماس پيدا نکند.

2- لام بر روي سطح افقي و صاف قرار داده می­شود.

3- با يک لام تميز ديگر (ترجيحا لام صيقلی) با زاويه °C45-40 با حرکت سريع بر روي قطره خون موجود بر روي لام اول کشيده شود (نظير تهيه گسترش خون در آزمونCBC ).

4- گسترش بايد سريعا در حرارت محيط خشک شود.

5- گسترش خشک شده بايد در محلول متانول به مدت چند ثانيه تثبيت گردد.

6- گسترش نازک بايد به گونه­اي تهيه شود که در يک انتها ضخيم و در انتهاي ديگر به حدي نازک باشد تا گلبول­هاي قرمز با هم همپوشاني نداشته باشند.

***نکته:***

***•• بايد از لام شيشه­اي تميز، بدون گرد و غبار و عاري از چربي استفاده نمود. علت ايجاد ناهمواري و يا حفراتي در گسترش چرب بودن لام يا کثيف بودن يا ناهموار بودن لبه لام دوم مي­باشد.***

***•• هر دو گسترش نيز مي­تواند بر روي يک لام تهيه گردد، در اين­صورت بايد فضايي بين دو گسترش وجود داشته باشد به­طوري که بتوان گسترش نازک را بدون آن­که گسترش ضخيم را متاثر سازد تثبيت نمود.***

***•• مشخصات بيمار بايد بايد با مداد سربي يا ماژيک غير قابل شست­وشو در ناحيه ضخيم گسترس نازک نوشته شود.***

***•• براي تسريع در عمل خشک شدن مي­توان از پنکه استفاده نمود (نبايد از شعله يا منابع ديگر حرارتي استفاده شود).***

***•• در مناطقي که رطوبت بالا است استفاده از گرمخانه °C25 جهت خشک نمودن لام­ها پيشنهاد مي­گردد.***

**ادرار**

نمونه ادرار براي بررسي­هاي شيميايي، سلول­شناسي و ميکروب­شناسي مورد استفاده قرار مي­گيرد. نحوه نمونه­گيري و ظروف جمع­آوري ادرار از عوامل مهم در کيفيت نمونه مي­باشد.

نمونه ادرار بايد در ظرف تميز دهان گشاد با قطر حداقل 10سانتي­متر، با اندازه مناسب و غير قابل نشت، جمع­آوري گردد. بهتر است ظرف جمع­آوری ادرار يک­بار مصرف بوده و درغير اين­صورت عاري از هرگونه آلودگي با مواد شوينده باشد. قابل ذكر است كه نمونه ادرار نبايد به مدفوع آلوده باشد.

جهت کشت ادرار ظرف نمونه باید حتما استريل باشد. برای نمونه­گيري از نوزادان و اطفال بايد از کيسه­هاي ادراري استفاده شود.

جهت بررسي­هاي معمول و ميکروبيولوژيک نمونه ادرار بايد حداکثر تا دو ساعت پس از جمع­آوري (در دماي اتاق) مورد بررسي قرار گيرد. پس از اين مدت ترکيبات شيميايي ادرار تغيير کرده و عناصر تشکيل دهنده آن شروع به تخريب مي­کنند. سيلندرها، گلبول­های قرمز و گلبول­های سفيد در نمونه­هاي با وزن مخصوص پایين و PH قليايي بسيار مستعد ليز هستند.

هنگامي که ارزيابي سلولي سديمان ادراري مدنظر است بايد مراحل آماده­سازي ادرار هرچه سريع­تر صورت گيرد. جهت تهيه رسوب ادرار بايد نمونه در ظروف درپوش­دار به مدت 5 دقيقه در g400 سانتريفیوژ گردد.

در بررسي­هاي ميکروبيولوژيک در صورتي­که نتوان نمونه را به سرعت به آزمايشگاه منتقل نمود و آزمـايش کـرد مـي­تـوان آن را بـه مدت 24 ساعت در دماي °C8-2 نگه­داري کرده و يا مي­توان از   
نگه­دارنده­هاي باکتريواستاتيک نيز استفاده نمود.

ظرف محتوي نمونه بايد به­درستي برچسب­گذاري شود، اطلاعات مورد نياز شامل: نام بيمار، زمان نمونه­گيري، نام نگه­دارنده، در موارد خاص ذکر نوع نمونه (کاتتر ......) می­باشد. هم­چنين در صورتي­که نمونه از محل ديگري ارسال گردد بايد نحوه نگه­داري و زمان دريافت نيز ذکر گردد.

حداقل حجم مورد نياز جهت بررسي­هاي معمول کمي و کيفي ادرار به­طور متوسط 12 ميلي­ليتر است، البته در اطفال و نوزادان ممکن است حجم کمتر نيز مورد بررسي قرار گيرد، ولي بايد حتما در برگه گزارش ذکر گردد.

**• انواع مختلف جمع­آوري ادرار و موارد استفاده آن**

1. ادرار اتفاقي جهت بررسي شيميايي کيفي و نيمه کمي
2. اولين ادرار صبحگاهي (ادرار 8 ساعته) جهت بررسي اجزاي سلولي، سيلندر و کست
3. دومين ادرار صبحگاهي (7-10صبح) جهت بررسي­هاي کمي
4. ادرار با زمان مشخص مثلا ادرار 24 ساعته جهت بررسي­هاي کمي
5. ادرار تمیز (ادرار مياني، کاتتر و سوپراپوبيک)

**\* ادرار اتفاقي**

اين نمونه جهت آزمون غربالگري روزمره مورد استفاده قرار مي­گيرد و در هر موقع از روز قابل جمع­آوري مي­باشد، ولي زمان نمونه­گيري بايد روي ظرف درج گردد. بهتر است قبل از جمع­آوري ادرار فرد چند ساعت ادرار خود را تخليه نكرده باشد. برای اين منظور اولين ادرار صبحگاهي به­دليل غلظت مناسب وPH پايين مناسب­تر است.

**\* ادرار صبح­گاهي (ادرار 8 ساعته)**

اين نمونه معمولا در اول صبح پس از بيدار شدن فرد جمع­آوري مي­گردد.

اين نمونه جهت بررسي پروتئين­اوري اورتواستاتيك مناسب است. ابتدا شب قبل از خواب ادرار تخليه شده و نمونه صبح پس از بيدار شدن فرد جمع­آوري مي­گردد. در صورت تخليه ادرار در طول شب، بايد در ظرف جمع­آوري نمونه ريخته شود.

**\* ادرار زمان­دار**

اين نمونه در يك زمان مشخص در طول شبانه روز تهيه مي­گردد، مثلا نمونه ناشتا، دو ساعت پس از غذا يا بلافاصله پس از ماساژ پروستات

**\* ادرار 24 ساعته**

بـه­دليـل تغييرات دوره­اي تـرشـح مـواد در ادرار، در بـعضـي مـواقع نيـاز است كه ادرار 24 ساعته   
جمع­آوري گردد. به­عنوان نمونه می­توان از كاتكول آمين­ها، 17هيدروكسي استروئيد و الكتروليت­ها نام برد که پایين­ترين غلظت آن­ها در صبح و بالاترين غلظت اين ترکيبات در ظهر يا كمي پس از آن مي­باشد.

**•• جمع آوری نمونه:** ظرف نمونه بايد پلاستيکي و دهان گشاد به گنجايش تقريبي 3 ليتر باشد.

جهت جمع­آوري نمونه ادرار 24 ساعته ابتدا اولين ادرار صبحگاهي دور ريخته شده و در طي 24 ساعت بعدي ادرار در ظرف نمونه­گيري جمع­آوري مي­شود به­طوري كه آخرين نمونه جمع­آوري شده، اولين نمونه صبحگاهي روز بعد (در همان ساعت اولين نمونه تخليه شده روز قبل) باشد.

بر روی برچسب روي ظرف محتوي نمونه علاوه بر نام و نام خانوادگي بايد تاريخ، ساعت شروع و پايان نمونه­گيري نيز ياداشت گردد و در صورت استفاده از ماده نگه­دارنده درج نام ماده نيز ضروری است.

در طول مدت جمع­آوري، ظرف نمونه بايد در يخچال يا درون يخ نگه­داري شود.

ممکن است جهت ادرار 24 ساعته از مواد نگه­دارنده استفاده گردد که با توجه به خطر زيستي اين مواد، بايد هشدارهاي لازم به بيمار داده شود.

**\* ادرار تميز**

جهت بررسي­هاي باکتري­شناسي از نمونه ادرار تميز استفاده مي­شود.

**•• نحوه جمع­آوری نمونه**

بيمار ابتدا دست­هاي خود را با آب و صابون شسته و سپس ناحيه تناسلي خود را با پنبه آغشته به آب و صابون تميز مي­نمايد، بخش اول ادرار را دور ريخته و بخش مياني ادرار را با رعايت شرايط استريل در درون ظرف جمع­آوري ادرار مي­ريزد و سپس بقيه ادرار را دور مي­ريزد.

**••** ادرار تهيه شــده تـوسـط کـاتـتـر و فـوق عـانـه (سوپرا پوبيک) نيز از روش­هايي هستند که جهت جمع­آوری ادرار استريل در مواقع خاص و با در خواست پزشک تهیه می­شوند.

**••** جهت نمونه­گيري از نوزادان و اطفال باید از کيسه جمع­آوري ادرار استفاده نمود. در صورتي­که بيمار در خواست کشت ادرار نيز داشته باشد، بايد نواحي شرمگاهي و پرينه­آل قبل از وصل کردن کيسه ادرار بـا آب و صابـون شسته شود. قابل ذکر است که کيسه ادرار بايد هر 15 دقيقه کنترل شده و پس از جمع­آوري، ادرار بايد در ظرف ديگري نگه­داري شود.

**• مواد نگه­دارنده ادرار**

مواد نگه­دارنده جهت نگه­داري ادرار بيش از 2 ساعت، بررسي ترکيبات ناپايدار در ادرار و پايداري نمونه جهت مطالعات ميکروبيولوژيک کاربرد دارد.

نگه­دارنده­هاي رايج اسيد استيک، اسيد بوريک و اسيد کلريدريک 6 نرمال مي­باشند. اين ترکيبات توکسيک بوده و داراي خطر زيستي مي­باشند. هم­چنين به­دليل امکان پاشيده شدن ادرار به هنگام تخليه در ظرف، بهتر است ابتدا نمونه در ظرف ديگري جمع­آوري شده و سپس به ظرف اصلي حاوي ماده نگه­دارنده منتقل گردد.

* **نگه­داري و انتقال نمونه**

جهت انتقال نمونه بايد درب ظرف کاملا محکم باشد تا امکان نشت نمونه به خارج از ظرف و محيط اطراف به حداقل برسد (در صورت امکان جهت انتقال می­توان ظرف نمونه را درون ظرفی دیگری قرارداد).

نمونه ادرار بايد در سريع­ترين زمان ممکن به آزمايشگاه منتقل شده و حداکثر در ظرف 2 ساعت در دماي اتاق بررسي گردد. در غير اين­صورت بايد نمونه پس از جمع­آوري در يخچال نگه­داري شود (دماي °C8-2).

در بررسي­هاي ميکروبيولوژيک در صورتي­که نتوان نمونه را به آزمايشگاه منتقل نمود و مورد بررسي قرارداد تمهيدات زير بايد صورت گيرد:

•• نمونه را مي­توان به مدت 24 ساعت در دماي °C8-2 تا قبل از کشت نگه­داري نمود.

•• مـي­تـوان قسمتي از نمونـه ادرار را جهت بررسی­هـای بيوشيميايي در ظـرف ديـگری که حـاوي نگه­دارنده باکتريو استاتيک است، نگه­داري نمود.

**مدفوع**

مدفوع نمونه مناسبی جهت تشخيص عوامل پاتوژن مولد اسهال باکتريايي، ويروسي و انگلي است. نمونـه­گيـري در زمـان مناسب (عـوامـل ويـروسي تا 48 ساعت و عوامل باکتريايي تا 4 روز از زمان شروع اسهال)، نحوه انتقال نمونه و شرايط بيمار در هنگام نمونه­گيري از عواملي هستند که رعايت آن­ها در شناسايي عامل پاتوژن بسيار کمک­کننده است. جهت جمع­آوری نمونه مدفوع بايد مواردی را در نظر داشت که به برخی از آن­ها در زير اشاره می­گردد:

•• بيمار نبايد از 15 روز قبل از نمونه­گیری آنتي­بيوتيک (نظير تتراسايکلين و سولفاناميد)، داروهاي ضد تک­تاخته، بيسموت، سولفات باريم، ترکيبات کائولين، روغن کرچک، هيدروکسيد منيزيم يا هرگونه داروي ملين مصرف کرده باشد.

•• تعداد دفعات نمونه­گيري بر اساس درخواست پزشك مي­باشد.

•• در صورت مشکوک بودن به عوامل باکتريایی سه نمونه در فاصله سه روز و در خصوص عوامل انگلی 3 نمونه که در طول 10 روز جمع­آوری شده مناسب است.

•• نبايد در یک روز بيش از يك نوبت نمونه از بيمار گرفته شود.

•• نمونه­گيری در بيمارانی که بيش از سه روز بستری شده­اند توصيه نمی­شود.

•• در نوزادان و اطفال می­توان از سواپ رکتال در محيط انتقالي استفاده نمود ولي این کار معمولا برای تشخيص ويروس­ها و عوامل انگلي پيشنهاد نمي­شود.

**• نمونه­گيري جهت عوامل باکتريايي مولد اسهال**

**\* نمونه مدفوع:** حداقل 5 گرم مدفوع بايد در ظرف در پيچ­دار تميز، عاري از مواد ضدعفوني­کننده و يا شوينده جمع­آوري گردد.

**\* سواپ مقعدي:** سواپ را با فروبردن در محيط انتقالي سترون، مرطوب کرده به اندازه 2-3 سانتي­متر در داخل اسفنگتر رکتوم فرو برده و بچرخانيد. سواب را بيرون کشيده پس از اطمينان از آغشتگي به مدفوع، سريعا به داخل محيط انتقال (کري بلر) فرو بريد. سپس لوله­هاي انتقال را در يخچال يا يخدان قرار دهيد.

در موارد اسهال ناشي از باکتري­هاي مهاجم مانند شيگلا، ساييدن سواپ به مخاط انتهايي روده جهت جمع­آوري نمونه بسيار مهم است.

**\* سواپ مدفوع:** در صورت لزوم به نگه­داري نمونه مدفوع بيش از 2 ساعت، مقدار اندکي از مدفوع و هرگونه بلغم يا تکه­هاي مخاط پوششي روده را با فروکردن سواپ سر پنبه­اي يا سر پلي­استري   
به­درون مدفوع سريعا به لوله حاوي محيط انتقالي تلقيح کنيد و در يخچال يا يخدان قرار دهيد.

**• محيط­هاي انتقالي**

**•• کري بلر:** این محیط براي انتقال بسياري از عوامل بيماري­زا کاربرد دارد. اين محيط نيمه جامد بوده، حمل و نقل آن آسان و پس از تهيه تا يکسال در دماي اتاق قابل نگه­داري است (به شرطي که حجم آن کاهش نيافته، علایم آلودگي و تغيير رنگ در آن مشاهده نگردد).

**•• آب پپتونه قليايي ((Alkalane Peptone Water=APW:** این محیط را می­توان را براي انتقال ويبريو استفاده نمود ولي اين محيط نسبت به کري بلر برتري ندارد و فقط در صورت عدم دسترسی به محیط کری بلر بايد مورد استفاده قرار گيرد (در صورتي که کشت بيش از 6 ساعت از زمان نمونه­گيري به تعويق بيافتد نبايد از اين محيط استفاده گردد). محيط فوق در دماي °C4 تا 6 ماه قابل نگه­داري است.

**•• سالين گليسرول بافره (Buffered Glycerol Saline=BGS):** این محیط براي شيگلا مورد استفاده قرار مي­گيرد و براي انتقال ويبريو مناسب نمی­باشد. اين محيط مايع بوده، لذا در حمل آن بايد دقت شود. هم­چنين تا 1 ماه پس از تهيه قابل استفاده است.

* **نگه­داري:**

•• نمونه­هاي مدفوع حداکثر تا 2 ساعت در يخچال قابل نگه­داري است. نمونه­هايي را که نمی­توان به فاصله 2 ساعت از نمونه­گيري کشت داد، بايد در محيط انتقالي قرار داده و سريعا در يخچال   
نگه­داري نمود.

•• محيط انتقالي حـاوي سـواپ مـدفـوع يا مقعد را مي­توان حداکثر 72-48 ساعت در دماي °C4 نگه­داري کرد. در غير اين­صورت اين محيط می­بايست ترجيحا در دماي (°C70-) و يا در صورت عدم دسترسي، در دماي (°C20-) قرار داد (يا حداقل در فريزرهاي خانگي نگه­داري شود).

•• نمونه­هاي مدفوع که از بيماران مبتلا به وبا گرفته مي­شود و در محيط انتقالي قرار مي­گيرد نيازي به نگه­داري در دماي يخچال ندارند، مگر آن که نمونه­ها در معرض دماي بالا (بيش از °C40) قرار داشته باشند.

**• نمونه­گيري جهت عوامل انگلي**

* **جمع­آوري نمونه**

•• برای انجام اين آزمايش حداقل 5 گرم مدفوع در ظرف دهان گشاد در پيچ­دار تميز و خشك مورد نياز است )در صورت آبکی بودن مدفوع معادل 5 سی­سی).

•• در صورتي که نتوان فاصله زماني مناسب بين جمع­آوري نمونه تا انجام آزمايش را رعايت نمود بايد نمونه در ماده نگه­دارنده جمع­آوري شود (يك قسمت مدفوع و سه قسمت ماده نگه­دارنده فرمالين 10%).

•• بايد توجه داشت که بررسي خصوصيات ظاهري نمونه در نمونه تازه صورت می گيرد.

•• نمونه مدفوع نبايد با گرد و خاک، آب و ادرار آلوده گردد، زيرا آلودگي اتفاقي با خاک و آب ممکن است باعث آلودگي نمونه با ارگانيسم­هاي داراي زندگي آزاد شود. ادرار نيز سبب تخريب تروفوزوئيت­ها مي­شود. ترجیحا نباید نمونه از کاسه توالت جمع­آوری گردد.

•• چون مرحله تروفوزوئيت تک ياخته خيلي زود از بين مي­رود، ثبت تاريخ و ساعت نمونه­گيري ضروري است.

* **نگه­داري**

•• نمونه بايد هر چه سريع­تر به آزمايشگاه ارسال گردد. در صورت تاخير بيش از 2 ساعت، نمونه در محل خنک (ترجيحا در يخچال) نگه­داري شود.

***توجه: جهت آزمايش­هاي شيميايي (مانند خون در مدفوع) به 50 گرم مدفوع نياز مي­باشد.***

**مايع مغزي نخاعي Cerebro-Spinal Fluid (CSF)**

جـمـع­آوري مـــايــع مــغـزي نـخـاعي تــوســط پـزشـک و بـه روش پـونـکسیـون نـخـاعــی (Lumber Puncture=LP) و به صورت کاملا استریل انجام می­گیرد.

معمولا مايع جهت آزمون­هاي شيميايي، ميکربيولوژيک و آناليز سلولي در 3 تا 4 لوله جمع آوری   
می­شود.

جهت آزمون­هاي باکتري­شناسي نمونه بايد در لوله درپوش­دار و استريل جمع­آوري گردد. لوله­ها بر اساس ترتيب جمع­آوري برچسب­گذاري مي­شوند (لوله شماره 1 جهت آزمايش­هاي بيوشيميايي، لوله شماره 2 جهت آزمايش­هاي ميکروب­شناسي، لوله شماره 3 جهت بررسي سلولي).

جهت جمع­آوري نمونه نيازي به ماده ضد انعقاد نمی­باشد زيرا مايع مغزي نخاعي لخته نمي­شود، مگر آن که نمونه­گيري همراه با صدمه باشد (نمونه­گيری تروماتيک).

الزامات مورد نياز جهت تهيه نمونه مايع مغزي نخاعي در جدول 1-3 بیان شده است.

**جدول 1-3: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی – نخاعی**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **نوع بررسي** | **ضد انعقاد** | **حجم مورد نياز** | **ملاحظات** |
| آزمون بيوشيميايي (پروتئين، قند...) | - | 5-3 | لوله شماره 1  در صورت نمونه گيری تروماتيک شمارش سلولي نيز از لوله شماره 1صورت می­گيرد. |
| کشت و رنگ­آميزي گرم | - | 5-3 | لوله شماره 2 |
| شمارش سلولي و تشخيص افتراقي | - | 5-3 | لوله شماره 3يا 4 |
| ساير بررسي­ها (سيتولوژي) | - | 5-3 | لوله شماره 4 |

نمونه بـايد در اسرع وقت به آزمايشگاه ارسال گردد. دژنراسيون سلولي در طي يک ساعت اتفاق مي­افتد، لذا حداکتر زمان گردش کاري نبايد بيش از 1 ساعت به طول انجامد. نقل و انتقال نمونه در دماي اتاق صورت مي­گيرد. جهت آزمون­هاي باکتریولوژيک نبايد نمونه در يخچال نگه­داري شود. از قرار دادن نمونه در معرض نور خورشيد و گرما بايد خودداري نمود. در صورت نياز به حمل نمونه تا مسافت دور، استفاده از يخدان ضروری است. در اين صورت نمونه تا 3 ساعت پايدار می­باشد. جهت نگه­داري طولاني مدت، نمونه ابتدا سانتريفیوژ شده پس از جداسازي سلول­ها، مايع­رويي در ظرف درپوش­دار شيشه­اي يا پلي­پروپيلن در دماي (°C70-) قابل نگه­داري است.

جهـت مطالعـات سيتولـوژيـک رسـوب CSF بـايد بلافاصله پس از جمع­آوري به­وسيله سانتريفیوژ مخصوص (20 دقيقه در g180) تهيه و به آزمايشگاه ارسال شود.

**مايع سروز**

مايعات سروزي نظير مايع جنب و صفاقي را مي­توان در يک لوله جمع­آوري و سپس در محل نمونه­گيري يا آزمايشگاه به لوله­های مختلف و با حجم­های کمتر تقسيم نمود. قابل ذکر است که نمونه قبل از تقسيم و شمارش سلولي بايد کاملا مخلوط گردد. EDTA ضد انعقاد پيشنهادي در خصوص شمارش و افتراق سلولي است.

جهت شمارش و افتراق سلولي، نمونه­ها تا 24 ساعت در دماي °C6-2 قابل نگه­داري هستند. در خصوص بررسي­هاي ميکروبي نمونه بايد در ظرف استريل جمع­آوري گردد.

جهت بــررسی­ سيتولوژي ممکـن است نمونــه در حجم­هـاي متفاوت بـه آزمـايشگـاه ارسال گردد   
(100-15ميلي­ليتر) ولی حجم پيشنهادي 50 ميلي­ليتر است و نياز به استفاده از لوله­هاي استريل و ماده ضد انعقاد نيز نمي­باشد. البته می­توان از هپارين و EDTA هم استفاده کرد.

الزامات مورد نياز جهت تهيه و آزمايش بر روی مايع سروز در جدول 2-3 بیان شده است.

**­جدول 2-3: الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **نوع بررسي** | **ضد انعقاد** | **حجم مورد نياز**  **(ميلي ليتر)** |
| انـدازه­گيـري پـروتـئين تـوتال، لاکتات دهيدروژناز، گلوکز و آميلاز | هپارين يا بدون ضد انعقاد | 8-5 |
| کشت و رنگ­آميزي گرم | سدیم پلی سولفانات (SPS) يا بدون ضد انعقاد يا ضدانعقاد بدون اثر باکتريوسيدي و باکتريواستاتيکي | 10-8 |
| شمارش سـلولـي (گلبول قـرمـز و سفيد) و تشخيص افتراقي | EDTA | 10-8 |
| کشت باکتري اسيد فست | SPS يا بدون ضد انعقاد يا ضد انعقاد بدون اثر باکتريوسيدي و باکتريواستاتيکي | 50-15 |
| رنگ آميزي PAP- بلوک سلولي | بدون ضدانعقاد، هپارين يا EDTA | 50-15 |

مايعات سروزي بايد در اسرع وقت و در دماي اتاق به آزمايشگاه منتقل شوند.

بررسي­هاي سيتولوژي نيز بايد هر چه سريع­تر صورت گيرند، و در صورت نياز می­توان نمونه را در دمای °C4 و بدون ماده تثبيت کننده تا چند روز نگه­داري نمود.

**مايع سينوويال**

حجم نمونه جهت بررسي­هاي آزمايشگاهي بسته به اندازه مفصل و نوع مايع تجمع يافته در مفصل متفاوت است. معمولا حجم 5-3 ميلي­ليتر ايده­ال است. در مفاصل کوچک ممکن است اين مقدار نمونه قابل تهيه نباشد، لذا حجم کمتر نيز قابل قبول است. قابل ذکر است که نمونه قبل از   
بررسي­هاي آزمايشگاهي بايد به­خوبي مخلوط گردد. در بعضي از مراجع ذکر شده که ضد انعقاد ليتيم هپارين وEDTA به­دليل ايجاد کريستال در نمونه و امکان اشتباه با کريستال­هاي پاتولوژيک، نبايد مورد استفاده قرار گيرد. نقل و انتقال نمونه بايد در دماي اتاق صورت گيرد.

الزامات مورد نياز جهت تهيه نمونه مايع سينوويال در جدول 3-3 بیان شده است.

**جدول 3-3: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **نوع بررسي** | **ضد انعقاد** | **حجم موردنياز (ميلي­ليتر)** | **ملاحظات** |
| شمارش سلولي و تشخيص افتــراقـــی، کــريستال­ها انکلوزيون­ها | هپارين -EDTA | 5-3 | بـر روي حـجـم کمتر (چنـديـن قطره) نيـز قابل انجام است |
| گلوکز  پروتئين | فلورايد يا بدون ضد انعقاد  بدون ضد انعقاد | 5-3  5-3 | تـرجيحــا 8 ســاعت ناشتايي |
| CH50 | بدون ضد انعقاد | 5-3 | در صـورت عدم انجام سـريع آزمـايش نمونه منجمد گردد. |
| C3,C4 | بدون ضد انعقاد يا EDTA |  | نـيـاز بـه 1 ميلي­ليتر نمونه است. |
| کشت | SPS، بدون ضدانعقاد يا ضد انعقاد بدون اثرباکتريوسيدي و باکتريواستاتيکي | 5-3 | نياز بـه لـولـه استريل است. |

**نمونه­هاي دستگاه تنفسي**

بهترين زمان جمع­آوري نمونه در اکثر عفونت­هاي تنفسي در طول 3 روز اول ايجاد علایم بيماري مي­باشد.

نمونه­ها بسته به محل عفونت، از قسمت فوقاني و تحتاني دستگاه تنفسي جمع­آوري مي­شوند. عوامل بيماري­زاي دستگاه تنفسي فوقاني (ويروسي و باکتريايي) در نمونه­هاي گرفته شده از قسمت نازوفارنژيال گلو و عوامل بيماري­زاي دستگاه تنفسي تحتاني در نمونه خلط قابل بررسي هستند. کشت ارگانيسم­هايي نظير لژيونلا مشکل است لذا بهتر است که تشخيص بر اساس شناسايی   
آنتي­ژن­هاي جدا شده از ادرار باشد. در صورت شک به التهاب حاد اپيگلوت، نمونه­گيري از گلو يا فارنژيال نبايد صورت گيرد زيرا استفاده از اين شيوه ممکن است سبب انسداد شديد تنفسي شود. معمولا التهاب اپيگلوت به­وسيله راديوگرافي گردن تاييد مي­گردد ولي عوامل اتيولوژيک ايجاد کننده آن ممکن است از کشت خون هم جدا گردند.

**• دستگاه تنفسي فوقاني**

**•• نمونه­برداري از گلو و لوزه­ها**

از بيمار خواسته می­شود تا دهان خود را باز نمايد و با آبسلانگ زبان وی را به پايين فشار داده، براي مشاهده نواحي ملتهب و اگزودا از چراغ قوه استفاده می­شود. سواپ استريل داکروني يا آلژينات کلسيم را چندین بار بر روي نواحي ملتهب و اگزوداي حلق می­کشیم. بايد توجه شودکه سواپ با سطح داخلي حفره دهاني تماس پيدا نکند. چنانچه سواب در طي 2-1ساعت پس از نمونه­گيري مورد آزمايش قرار نگيرد در يک لوله استريل درپوش­دار حاوي محيط انتقالي باکتريايي يا ويروسي قرار داده مي­شود (انتهاي سواپ که با دست در تماس بوده بايد شکسته شود و درپوش ­در جاي خود قرار گيرد).

جهت تهيه گسترش مستقيم با سواپ استريل ديگري به روش ذکر شده نمونه­گيري صورت   
مي­گیرد.

**•• نمونه­برداري از انتهاي بيني و نازوفارنکس**

به­وسيله يک سواپ انعطاف­پذير استريل وارد سوراخ بيني شده و از نازوفارنکس نمونه تهيه گردد. سر بيمار بايد کمي به عقب برده شود. در افراد بالغ سواپ را حدود 5-6 سانتي­متر وارد بيني کرده تا مطمئن شويد كه سواپ وارد ناحيه خلفي فارنكس شده است، در همان وضعيت سواب را چند ثانيه نگه­داشته و سپس به آرامي بچرخانيد. از هر سوراخ بيني دو سواپ گرفته می­شود که يکي جهت گسترش مستقيم و ديگري جهت کشت استفاده مي­گردد.

* **آسپيراسيون نازوفارنکس**

اين روش در کودکان و نوزادان از سواپ راحت­تر و کارآمدتر است. با کاتتر سیليکون ترشحات را آسپيره نماييد.

**• دستگاه تنفسي تحتاني**

* **روش جمع­آوري خلط**

يک نمونه خلط مناسب حاوي مواد ترشحي حاصل از ريه­ها پس از سرفه عميق است (نمونه حاوي آب دهان، ترشحات حلق و بيني مناسب نمي­باشد).

**•• زمان نمونه­گيري**

به­دليل اين­که تعداد باسيل سل دفع شده در زمان­هاي مختلف متفاوت مي­باشد، آزمايش يک نمونه خلط براي تشخيص کفايت نمي­­کند و حتما بايد سه نمونه تهيه گردد. برای تهيه نمونه بيمار بايد ناشتا باشد. در خصوص تعداد نمونه جمع­آوری شده جهت ساير عوامل باکتريايی ِيک نمونه کفايت مـی­کند ولـي درصـورت شـک بـه­وجـود عـوامل قارچی و عفونت مايکوباکتريوم سه نمونه جداگانه صبحگاهی مناسب می­باشد.

نمونه اول: در اولين مراجعه بيمار به واحد درماني تهيه می­گردد و ظرف جهت نمونه­گيری دوم نيز تحويل داده می­شود.

نمونه دوم: خلط صبحگاهي که بيمار قبل از برخاستن از جای خود و به­صورت ناشتا در منزل تهيه می­نمايد.

نمونه سوم: خلط صبحگاهي که همزمان با مراجعه بيمار براي تحويل نمونه دوم از بيمار گرفته   
می­شود.

نمونه بايد در ظرف دهان گشاد از جنس پلاستيک قابل سوختن شفاف و محکم با قطر حدود 7-5 سانتي­متر جمع­آوري گردد (نمونه داخل آن از نظر مقدار و کيفيت قابل رويت بوده و هم­چنين   
به­راحتي سوزانده و معدوم گردد). جهت جلوگيري از نشت خلط از داخل ظرف به بيرون، باید از ظرف در پيچ­دار استفاده نمود. در صورت عدم دسترسي به ظـرف پـلاستيکي با مشخصات فوق مي­توان از ظروف شيشه­اي دهان گشاد در پيچ­دار استفاده نمود (با رعايت اصول استريليزاسيون).

* **نحوه نمونه­گيري**

بيمار صبح ناشتا در فضاي باز ابتدا يک نفس عميق کشيده و با سرفه­هاي عميق خلط را درون ظرف (در حالي که ظرف نزديک لب­هاي بيمار قرار دارد) تخلیه می­کند. سپس درب آن را بسته و در کيسه نايلوني قرار می­دهد. بهتر است حجم خلط بين 5-3 ميلي­ليتر باشد.

در صورتي که بيمار نتواند با سرفه کردن براي انجام آزمايش، نمونه خلط بدهد بايد به روش زير عمل شود:

بيمار روي تخت معاينه طوري بخوابد که صورت او رو به پايين بوده و سر او پايين­تر از سينه قرار گيرد. سپس پس از دم عميق نفس خود را نگه­داشته با يک بازدم محکم خلط را خارج کند. اين عمل بايد تا تهيه نمونه کافي از خلط ادامه يابد.

* **نگه­داري:** بايد نمونه هر چه سريع­تر به آزمايشگاه ارسال گردد. در غير اين­صورت در محل خنک (ترجيحا در يخچال) نگه­داري شود.

•• همه نمونه­هاي تنفسي به جز خلط، بايد در محيط کشت انتقالي مناسب باکتري­ها/ ويروس­ها منتقل گردند.

••نمونه­هاي باکتريايي تا مدت 24 ساعت در دماي محيط و ويروس­ها در محيط انتقالي مناسب در دمای °C8-4 قابل انتقال مي­باشند.

**جمع­آوري نمونه چشم**

سواپ­ها و گسترش­هاي قرنيه و ملتحمه نمونه­هاي معمول جهت تشخيص کونژکتيويت حاد ناشي از عوامل باکتريايي و ويروسي مي­باشند. تمام نمونه­هاي گرفته شده از ترشحات قرنيه و ملتحمه بايد از نظر اين­که از چشم چپ يا راست تهيه شده، برچسب­گذاري گردند. جهت جمع­آوري اين نمونه­ها بايد شرايط استريل رعايت گردد. قبل از نمونه­برداري بيمار نبايد دارو يا قطره­اي استفاده کرده باشد. قابل ذکر است که نمونه­برداري از تراشه­هاي قرنيه بايد توسط پزشک متخصص چشم صورت گيرد.

**روش جمع­آوري سواپ­هاي ملتحمه**

مراحل جمع­آوری سواب­های ملتحمه به شرح زیر است:

1- پوست اطراف چشم را با يک ماده ضد عفوني­کننده ملايم تميز کنيد.

2- سواپ استريل آلژينات کلسيم يا نخي را در سرم استريل مرطوب کرده و به­طور دوراني بر روي ملتحمه بماليد.

3- سواپ را در لوله در پيچ­دار حاوي محيط انتقالي مناسب قرار دهيد.

4- بر روي لوله مذکور علاوه بر نام بيمار، نوع نمونه و زمان جمع­آوري نمونه نيز ذکر گردد.

5- از سواپ ملتحمه نيز دو گسترش بر روي يک لام تهيه مي­گردد. اين کار بهتر است در محل   
نمونه­برداري صورت گيرد. جهت شناسايي کلاميديا مهم است که گسترش­ها در محل نمونه­برداري و قبل از انتقال تهيه شود. گسترش­ها برچسب­گذاري شده و نبايد در دماي يخچال نگه­داري شده يا منجمد گردند.

**• نقل و انتقال نمونه**

نمونه جهت شناسايي باکتري­هاي پاتوژن در دماي محيط، در محيط انتقالي مناسب انتقال داده مي­شوند.

نمونه جهت شناسايي ويروس­هاي پاتوژن در دماي °C8-2 در محيط انتقالي مناسب انتقال داده مي­شوند.

گسترش­هاي تهيه شده در هوا خشک شده و در دماي محيط در جعبه لام منتقل مي­شوند.

**تهيه نمونه جهت کشت خون**

ضروري است دقت بيشتري جهت ضد عفوني­كردن محل نمونه‌گيري صورت گيرد. ابتدا موضع با الـكل 70% تميز شـده سپس با محلول povidne–iodine 10-1% (يا كلرهگزيدين گلوكونات) ضد عفوني شـده و پـس از خشـك شـدن مـوضـع مجددا جهت حذف يد و كلرهگزيدين با الكل تميز مي­گردد. کلرهگزيدين گلوكونات جهت نوزادان دو ماهه و بزرگ­تر و هم­چنين بزرگسالان داراي حساسيت نسبت به يد پيشنهاد مي‌گردد. به­دنبال خون‌گيري بايد خون در عرض 1 دقيقه به محيط کشت تلقيح شود. درب شيشه‌هاي كشت خون نيز بايد قبل از تلقيح با الکل 70% و سپس با محلول povidne–iodine 10-1% (بتادين) ضدعفوني گردد.

محيط کشت تلقيح شده را چندین بار تکان داده، بلافاصله به آزمايشگاه منتقل شده و در انکوباتور °C35 قرار داده شود.

**• حجم خون مورد نياز**

•• کـودکـان: حجم 3-1 ميلي­ليتر ختون کـافـي مـی­باشد. اين مقدار خون در 20 ميلي­ليتر محيط کشت خون رقيق مي­گردد.

•• بزرگسالان: حجم خون جمع­آوري شده به ميزان 10-5 ميلي­ليتر است که در 50 ميلي­ليتر از محيط کشت خون رقيق مي­گردد.

**• روش خنثي­سازي عوامل ضد ميکروبي در خون**

با اضافه نمودن مهار کننده­هاي شيميايي نظير سديم پلي آنتول سولفانات (SPS) 05/0%-025/0% به محيط کشت و رقيق­سازي خون، ويژگي­هاي باکتريسيدال خون و آنتي بيوتيک­هاي احتمالي خنثي مي­گردد. قابل ذکر است که سديم پلي آنتول سولفانات (SPS) فعاليت­هاي ضد فاگوسيتي، ضد کمپلماني، ضد انعقادي و ضد ليزوزمي دارد و اگر اين ماده در مقادير خيلي بالا استفاده شود، اثر مهارکنندگي در رشد ميکروب­ها خواهد داشت.

**• کشت مجدد**

شيشه­هاي کشت خون را ظرف 24-6 ساعت (صرف نظر از وجود علايم رشد) کشت مجدد داده و سپس تا هفت روز هر روز بررسي کنيد. هر نوع کدورت يا ليز گلبول­هاي قرمز ممکن است نشانگر رشد ميکروبي باشد و به­طور حتم بايد بلافاصله کشت مجدد انجام شود.

قابل ذکر است که ممکن است علي­رغم عدم وجود کدورت، رشد ميکروبي وجود داشته باشد، لذا ضروري است در فواصل24-6 ساعت اوليه بعد از تلقيح، راس 48 ساعت و نيز در روز هفتم نيز کشت مجدد صورت گيرد.

•• قبل از انجام کشت مجدد شيشه کشت خون بايد چند بار تکان داده شود.

•• جهت برداشت خون از محيط کشت، درپوش محيط کشت را با الکل و بتادين ضد عفوني کرده و حدود 5/0 ميلي­ليتر از نمونه را به محيط آگار انتخاب شده منتقل کنيد.

**نمونه­برداری از مجاری ادراری تناسلی مردان**

با دو سواپ استريل از ترشحات چرکی نمونه­برداری کنيد. يکی از سواپ­ها جهت تهيه گسترش و ديگری جهت کشت مورد استفاده قرار می­گيرد. در صورتی­که ترشحی مشهود نباشد با سواپ نازک به اندازه 3-2 سانتی­متر درون مجرا وارد شده و قبل از بيرون آوردن در مجرا چرخانده شود.

در صورتی­که آزمايش با تاخير انجام گيرد، سواپ بايد در محيط انتقالی نگه­داری شود.

**نمونه­برداری از دهانه رحم- ترشحات واژن**

جهت نمونه­گيری ابتدا سرويکس با کمک اسپيکولوم که با آب گرم مرطوب شده مشاهده می­شود (بدون استفاده از مواد Lubricant). قبل از نمونه­گيری بايد تمامی ترشحات از دهانه خارجی رحم پاک شود. با يک سواپ استريل تا حدود 3-2 سانتی­متر درون دهانه رحم وارد شده و چند ثانيه در محل چرخانده شود تا ترشحات جذب سواپ گردد سپس بدون تماس با سطح واژن سواپ بايد خارج شده و در لوله درپوش­دار استريل قرار گيرد. سواپ بايد فورا در محيط کشت مناسب کشت داده شود و يا به کمک محيط انتقالی به آزمايشگاه ارسال گردد. جهت تهيه گسترش مستقيم با سواپ استريل ديگري به روش ذکر شده نمونه­گيري صورت مي­گيرد.

تـرشحـات واژن بـا استفاده از اسپيکـولوم (بـدون استفـاده از مواد Lubricant) و سواپ استريل از فـورنيکس خـلفـی گـرفته می­شود. نمونه با سه سوآپ گرفته مي­شود، يکی را جهت تهيه گسترش مرطوب در لوله درپوش­دار محتوی سرم فيزيولوژی استريل قرار داده و دو تای ديگر جهت کشت و تهيه گسترش مستقيم مورد استفاده قرار می­گيرند.

در صورت مشکوک بودن به نايسريا نمونه پس از تهيه سريعا در دمای اتاق به آزمايشگاه ارسال   
می­شود.

سواپ­های آلژينات کلسيم و بعضی سواپ­های پنبه­اي مهار کننده نايسريا بوده، لذا بهتر است از سواپ داکرون يا ريون استفاده شود.

**جمع­آوری نمونه جهت ضايعات پوستی**

در اکثر ضايعات پوستی تشخيص ممکن است بر اساس مشاهده ظاهری و تاريخچه­ی بيماری بدون جمع­آوری نمونه­های تشخيصی صورت گيرد. در مشاهده ظاهری ضايعه، نکات مهمی از قبيل نوع ضايعه پوستی (اريتماتوس، ماکولار، پاپولار، ماکولوپاپولار، وزيکولار، بولوس، پتشيال، پورپوريک و غيره) و نحوه پراکندگی آناتوميک ضايعه (مرکزی، محيطی منتشر و غيره) بايد در نظر گرفته شود. در مواردی با تشخيص نامعلوم، غيرمعمول و نادر ممکن جمع­آوری نمونه از راش­ها يا ضايعات پوستی نياز باشد. در موارد راش­های وزيکولار، نمونه­ها جهت بررسی ميکروسکوپی و کشت نمونه مستقيما از وزيکول­ها تهيه می­گردد. در خصوص ساير ضايعات اگزانتوماتو (ماکولار يا پاپولار) ممکن است تشخيص بيشتر بر پايه ساير روش­ها، نظير کشت خون و سرولوژی صورت گيرد.

در موارد مشکوک به آنتراکس پوستی يا ضايعات خيارکی ممکن است نمونه­ها از زخم­های پوستی و هم­چنين نمونه برای کشت خون تهيه شود.

**• روش جمع­آوری**

**\* راش­های وزيکولو - پوستولار (جهت تشخيص عفونت­های ويروسی)**

زخم يا وزيکول تازه و رسيده را با اتانول 70% تميز نماييد.

**وزيکول:** سرنگ توبرکولين با سوزن 27-26 را در حالی که سر سوزن آن به سمت بالا قرار دارد، در پايه وزيکول وارد کنيد.

مايع را آسپيره نموده و سريعا و با دقت به داخل ظرف حاوی 2-1 ميلی­ليتر محيط انتقال ويروسی تخليه نماييد (يک­بار سرنگ را با محيط انتقالی شست­وشو دهيد).

**زخم:** پوسته زخم را بالا آورده و به کمک سواپ استريل داکرونی بر روی پايه زخم بماليد (سواپ آلژينات کلسيم نبايد استفاده شود). سپس سوآپ به سرعت در ظرف حاوی محيط انتقال قرار گيرد.

**تهيه گسترش:** پايه زخم به کمک اسکالپل يا کورت تراشيده شده و سوسپانسيوني از ضایعات در دو تا سه قطره از محيط انتقالی تهيه نماييد. از سوسپانسيون فوق دو تا سه قطره بر روی لام بگذاريد. پس از خشک شدن در هوا در استون سرد فيکس نماييد.

**\* نمونه کبره**

•• به وسيله لانست و فورسپس يک­بار مصرف، کبره­ها را از محل خودش جدا نماييد.

•• 10-5 لايه کبره را برداشته و در ظرف پلاستيکی در پيچ­دار قرار دهيد.

•• اگر مشکوک به آنتراکس جلدی هستيد، مايع وزيکولی زير محل زخم نمونه تشخيصی بهتری نسبت به تکه­های زخم می­باشد.

**\* آسپيراسيون آبسه­ها**

•• آسييراسيون آبسه فقط بايد توسط پزشک صورت گيرد.

•• پوست روی آبسه / خيارک بوسيله ايزو پروپيل الکل 70% ضد عفونی شده و مايع به­ وسيله آسپيراسيون توسط سرنگ استريل جمع آوری می گردد.

•• نمونه را به­طريق آسپتيک به لوله استريل حاوی محيط انتقالی منتقل کنيد.

**• انتقال نمونه**

نمونه­ها جهت بررسی باکتريولوژيک بايد در محيط آستوارت يا آميس و سواپ­های مشکوک به عوامل ويروسی در محيط انتقالی ويروس منتقل گردد.

در صورتی که نتوان نمونه­ها را تا مدت 2 ساعت بررسی نمود، نمونه­هاي باکتريايي به مدت 24 ساعت در دماي محيط قابل نگه­داری هستند. نمونه­ها جهت جداسازی عوامل ويروسي در محيط انتقالي مناسب در دمای °C8-4 قابل نگه­داری بوده و در اسرع وقت بايد به آزمايشگاه منتقل گردد.

**نگه­دارنده­ها، ضد انعقادها و مواد افزودنی**

مواد نگه­دارنده جهت نمونه­های خون، ادرار، مغز استخوان، مدفوع و مايعات بدن استفاده می­گردند.

**• ضد انعقادهای رایج جهت نمونه خون**

ضد انعقادهای رايج مورد استفاده جهت نمونه خون شامل موارد زير می­باشند:

•• اتيلن دی آمين تترا استيک اسيد (EDTA)، سيترات سديم، هپارين، سديم پلی سولفانات (SPS)، فلورايد سديم و اسيد سيترات دکستروز (ACD) می­باشد.

اتيلـن دی آميـن تتـرا استيک اسيد (EDTA)که به اشکال نمک­های سديم و پتاسيم و ليتيم موجود است. مورد استفاده آن در بخش­های خون­شناسی، بيوشيمی و بانک خون می­باشد. جهت شمارش سلول­های خونی و تشخيص افتراقی نمک پتاسيک آن توصييه می­گردد.

•• سيترات سديم جهت آزمون­های انعقادی و سرعت رسوب گلبولی کاربرد دارد.

•• هپارين به فرم نمک­های ليتيم و سديم در اندازه­گيری بسياری از پارامترهای خون و بررسی­های ايمونولوژيک به همراه آزمون مقاومت گلبولی کاربرد دارد.

•• فلورايد سديم جهت اندازه­گيری گلوکز کاربرد دارد.

•• سديم پلی سولفانات به­عنوان ضد انعقاد جهت شيشه­های کشت خون استفاده می­گردد.

•• اسيد سيترات دکستروز به­عنوان ماده ضد انعقاد در کيسه­های خون در انتقال خون کاربرد دارد.

**• نگه­دارنده­ها در خصوص نمونه­های ادرار و مدفوع**

انواع نگه­دارنده­ها در خصوص نمونه­های ادرار و مدفوع به شرح زیر می­باشد:

•• جهت کشت ادرار و شمارش کلنی اسيد بوريک مناسب می­باشد. با استفاده از نگه­دارنده نمونه ادرار تا 24 ساعت در دمای اتاق جهت بررسی باکتريولوژيک قابل نگه­داری است.

•• نمونه مدفوع جهت کشت عوامل باکتريايی را در صورتی که نتوان سريعا به آزمايشگاه ارسال نمود تا 2 ساعت در دمای °C4 قابل نگه­داری است، در غير اين­صورت نمونه­ها را می­توان در محيط­های نگه­دارنده و انتقالی نظير استوارت، آميس و کری­بلر منتقل نمود. در بعضی مواقع   
می­توان با اضافه نمودن زغال به محيط استوارت و آميس اسيدهای چرب موجود در سواپ­های پنبه­اي، که بازدارنده ارگانيسم­های سخت رشد نظير نايسريا گونوره و بوردتلا پرتوسيس می­باشند را جذب نمود.

•• مدفوع از نظر توکسين کلسترديوم دیفيسيل بايد بدون مواد نگه­دارنده جمع­آوری گردد و اين نمونه تا 48 ساعت در دمای °C4 قابل نگه­داری است. در صورت تاخير بيشتر، نمونه بايد در دمای °C70- نگه­داری گردد.

•• نگه­دارنده مناسب جهت تخم انگل، تروفوزيت وکیست تک یاخته فرمالين 10%، پولی وينيل الکل و سدیم استات فرمالین (Sodium Acetate Formalin = SAF) است.

**• مواد ضد انعقاد در بررسی­های ميکروبيولوژی**

جهت جلوگيری از ايجاد لخته در نمونه­های خون، مغز استخوان و مايع سينوويال از مواد ضد انعقاد استفاده می­شود. باند شدن ميکروارگانيسم­ها به لخته، شناسايی آن­ها را مشکل می­سازد، لذا استفاده از ضد انعقاد ضروری است. انتخاب نوع و غلظت ضد انعقاد به­دليل اثر ضد ميکروبی بعضی از آن­ها از اهميت زيادی برخوردار است.

•• سديم پلی آنتول سولفات ((SPS معمول­ترين ضد انعقاد مورد استفاده جهت نمونه­های ميکروبی می­باشد. غلظت مورد استفاده نبايد بيشتر از 025/0 (وزنی/ حجمی) باشد. گونه­های نايسريا و بعضی باکتری­های بی­هوازی به غلظت­های بالای سديم پلی آنتول سولفات ((SPS حساس هستند. نسبت نمونه به ضد انعقاد سديم پلی آنتول سولفات بسيار مهم است، لذا لازم است حجم­های متفاوت از ضد انعقاد در لوله با سايز بزرگ (جهت نمونه بزرگسال) و کوچک (جهت نمونه اطفال) و هم­چنين جهت مقادير کم ارگانيسم در نمونه­های مغز استخوان و مايع سينوويال موجود باشد.

•• هپارين ديگر ماده ضد انعقاد متداول می­باشد و اغلب جهت کشت ويروسی و جداسازی گونه مايکوباکتريوم از خون مورد استفاده قرار می­گيرد. البته هپارين مهارکننده رشد باکتری­های گرم مثبت و قارچ هاست.

***سيترات سديم و EDTA جهت نمونه­های ميکروبيولوژيک نبايد مورد استفاده قرار گيرد.***

**نگه­داری نمونه**

در صورتی­که نتوان نمونه­ها را در اسرع وقت پس از دريافت نمونه مورد بررسی قرار داد، بايد آن­ها را در شرايط مناسب نگه­داری کرد. دماهای متفاوت مورد استفاده، دمای اتاق (°C22)، دمای بخچال (°C4)، دمای بدن (°C37) و دمای فريزر (°C20- °C70-) می­باشند که بسته به نوع محيط انتقالی (درصورت استفاده) و عامل اتيولوژيک عفونت متفاوت است.

بعضی نمونه­ها نظير ادرار، مدفوع، نمونه جهت بررسی عوامل ويروسی، خلط، سواپ­ها (به­غير از عوامل بی­هوازی)، وسايل خارجی نظير کاتتر را مي­توان در دمای °C4 نگه­داری نمود.

•• پاتوژن­هايی که به سرما حساسند بايد در دمای اتاق نگه­داری شوند. اين عوامل ممکن است در نمونه­هايي که حاوی باکتری­های بی­هوازی بوده و هم­چنين در اکثر مايعات استريل بدن، نمونه­های ژنيتال، سواپ گوش و چشم نيز موجود باشند.

•• سرم جهت بررسی­های سرولوژيک تا يک هفته در دمای °C20– قابل نگه­داری است.

•• نگه­داری طولانی مدت بافت­ها يا نمونه­ها در دمای °C70- صورت می­گيرد.

•• مايع مغزی نخاعی در صورتی­که سريعا مورد بررسی قرار نگيرد تا 6 ساعت در دمای °C35 قابل نگه­داری است. جدول 4-3 شرايط نگه­داری نمونه­های مختلف را نشان می­دهد.

**جدول 4-3: شرايط نگه­داری نمونه**

**­­**

|  |  |
| --- | --- |
| **دمای °C4** | **دمای اتاق (°C26-22)** |
| نوک کاتتر (IV) | آبسه- زخم- ضايعه |
| مايع مغزی نخاعی جهت شناسايی ويروس | مايعات بدن |
| گوش خارجی | مايع مغزی نخاعی جهت شناسايی باکتری |
| مدفوع (بدون نگه­دارنده) | گوش داخلی |
| مدفوع جهت توکسين کلسترديوم دیفیسيل تا 3 روز  (بيشتر از 3 روز نگه­داری در °C70-) | مدفوع (با ماده نگه­دارنده) |
| خلط | تناسلی |
| ادرار (بدون نگه­دارنده) | بينی- نازوفارنکس – گلو |
|  | بافت |
|  | ادرار (با ماده نگه­دارنده) |

**موارد رد نمونه**

موارد رد نمونه به شرح زیر بیان می­گردد:

•• عدم هم­خوانی اطلاعات برگه درخواست آزمايش و برچسب روی نمونه

•• استفاده از محيط انتقالی نامناسب

•• جمع­آوری نمونه در ظرفی که دارای نشت است

•• نمونه ناکافی

•• زمان انتقال بيش از 2 ساعت در نمونه­های بدون مواد نگه­دارنده

•• انتقال نمونه در دمای نامناسب

•• خشک شدن نمونه

•• دريافت نمونه در محلول فيکساتيو نظير فرمالين (نمونه مدفوع مستثنی می­باشد)

•• درخواست کشت بی­هوازی بر روی نمونه­هايی که باکتری­های بی­هوازی فلور طبيعی آنهاست. (مثل واژن، دهان)

•• نمونه حاصل از کاتتر فولی

•• بيش از يک نمونه با يک منشا از يک مريض در همان روز (به­غير از موارد کشت خون)

•• نمونه سواپ با درخواست­های متعدد برای ارگانيسم­های مختلف

•• نمونه خلط که در رنگ­آميزی گرم کمتر از 25 سلول سفيد و بيش از 10 سلول اپی­تليال در بزرگ­ نمايی پايين داشته باشد.

در جدول 5-3 تحت عنوان مدیریت نمونه و راهنمای برخورد با آن به­طور خلاصه مباحث این فصل بیان گردیده است.

**اقتباس از كتاب " اصول مستندسازي و مستندات در آزمايشگاه پزشكي"**

****

****

****

****

****

****

****