مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

مقدمه

نتایج آزمایش‌ها تحت تاثیر متغیرهای گوناگونی است که شناسایی آن‌ها و بدنبال آن استاندارد نمودن روش‌های آزمایشگاهی جهت تفسیر و استفاده بهینه از داده‌های آزمایشگاهی ضروری است. این متغیرها شامل مراحل قبل از، حین و پس از آزمایش می‌باشند. در سال‌های اخیر با توجه به تاکید بر اجرای روش‌های کنترل کیفی در کلیه بخش‌های آزمایشگاه در مرحله حین آزمایش و به‌دنبال آن برگزاری دوره‌های آموزشی در این خصوص، خطاهای حین آزمایش به حداقل رسیده است و لذا تاثیر متغیرهای قبل و بعد از آزمایش بسیار پررنگ شده است.

با توجه به اهمیت متغیرهای قبل از آزمایش در این فصل سعی شده است مجموعه‌ای از دستورالعمل‌های کاربردی در خصوص مدیریت نمونه بیان گردد که این موارد شامل: نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های بالینی، شامل خون و سایر مایعات بدن، آماده‌سازی نمونه، جابجایی و نقل انتقال نمونه، شرایط نگه‌داری و موارد رد نمونه می‌باشد.

بدیهی است رعایت موارد ذکر شده در این مجموعه در به حداقل رساندن عواملی که می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تاثیر قرار دهد، کمک شایانی خواهد نمود.

تجهیزات لازم جهت اتاق نمونه‌برداری

نمونه‌گیری باید در یک محل مجزا، تمیز و ساکت صورت گیرد. این اتاق بهتر است مجهز به دستشویی بوده و در صورت عدم دسترسی به آب، باید محلول‌های تمیزکننده دست موجود باشد.

۱- صندلی نمونه‌برداری: باید دارای دسته قابل تنظیم باشد به‌طوری که بیمار بتواند در راحت‌ترین وضعیت جهت نمونه‌گیری روی صندلی بنشیند. هم‌چنین صندلی باید دارای حفاظ ایمنی جهت جلوگیری از افتادن بیمار باشد.

۲- تخت معاینه

۳- سینی جمع‌آوری ظرف‌های نمونه

۴- دستکش

- *دستکش در صورت آلودگی و یا در فواصل نمونه‌گیری‌ها باید تعویض گردد.*

۵- سوزن (19–23G)

۶- سرنگ یا نگه‌دارنده مخصوص (holder) جهت استفاده از لوله‌های خلاء (evacuated tube)

۷- نیشتر یک‌بار مصرف

۸- انواع لوله‌ها و ظروف در پیچ‌دار یا لوله‌های خلاء

۹- بازوبند (tourniquet)

۱۰- یخچال یا یخ باید در دسترس باشد

۱۱- ضدعفونی کننده‌ها:

- ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪
- محلول povidone – iodine ۱٪-۱۰ یا کلر هگزیدین گلوکونات جهت کشت خون

۱۲- گاز پارچه‌ای در ابعاد ۵×۵ cm یا ۷/۵×۷/۵ cm (استفاده از پنبه پیشنهاد نمی‌گردد). باند و گاز باید جهت پانسمان در دسترس باشد.

۱۳- ظروف مخصوص دفع سرسوزن‌های آلوده (Puncture Resistant Disposal Container)

۱۵- فهرست انواع آزمایش‌ها و درج مقدار خون لازم برای هر آزمایش و نوع لوله مورد استفاده

۱۶- روتاتور جهت مخلوط نمودن لوله‌های محتوی خون

نمونه‌گیری وریدی

مراحل نمونه‌گیری

خون‌گیری صحیح نیاز به دانش و مهارت توام دارد. جهت جمع‌آوری نمونه خون وریدی، خون‌گیر کار آزموده باید مراحل زیر را پی‌گیری نماید:

۱- انطباق مشخصات برگه درخواست آزمایش با مشخصات بیمار

۲- اطمینان از رعایت رژیم غذایی پیش از نمونه‌گیری

۳- انتخاب وسایل مورد نیاز

سرنگ و سرسوزن مناسب یا لوله خلاء براساس نوع آزمایش انتخاب می‌شود.

**** به‌طور کلی توصیه می‌گردد به‌دلیل رعایت اصول ایمنی از سرنگ و سرسوزن استفاده نشود و لوله‌های خلاء جایگزین آن گردند.***

۴- استفاده از دستکش

۵- وضعیت بیمار هنگام نمونه‌گیری

بیمار بر روی صندلی نمونه‌گیری نشسته و دست خود را به منظور برجسته شدن وریدها مشت کرده و به نحوی روی دسته صندلی نمونه‌برداری قرار می‌دهد که بازو تا مچ دست در یک خط مستقیم قرار گیرند. باید توجه داشت که بیمار نباید مشت خود را باز و بسته نماید زیرا باز و بسته کردن مشت باعث تغییر بعضی مواد در خون می‌شود.

۶- بستن تورنیکه

به منظور افزایش پر شدن ورید از خون و برجسته شدن رگ مورد نظر و جهت تسهیل ورود خون به‌داخل سرنگ یا لوله‌های خلاء از رگ‌بند (تورنیکه) استفاده می‌شود (قابل ذکر است در مواردی نظیر اندازه‌گیری لاکتات خون نباید تورنیکه بسته شود).

رگ‌بند باید۱۰-۷/۵ سانتی‌متر بالای ناحیه نمونه‌گیری بسته شود و نباید بیش از یک دقیقه بر روی بازوی بیمار بسته بماند.

۷- انتخاب ورید مناسب

در اغلب موارد نمونه‌گیری از وریدهای Median cubital و Cephalic صورت می‌گیرد. خون‌گیری از وریدهای پشت دست نیز قابل قبول است، ولی وریدهای سطح داخلی مچ نباید مورد استفاده قرار گیرند.

۸- تمیزکردن محل نمونه‌گیری

ناحیه نمونه‌گیری به کمک گاز آغشته به ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل۷۰٪ به‌صورت حرکت دورانی از داخل به خارج تمیز می‌شود. نمونه‌گیری پس از خشک شدن موضع در هوا، به‌منظور جلوگیری از همولیز و کاهش سوزش ناشی از تماس نوک سوزن با الکل و پوست، صورت می‌گیرد.

۹- نمونه‌گیری

باید سر سوزن در حالی که قسمت مورب نوک آن به سمت بالا است، با زاویه ۳۰°C یا کمتر وارد ورید شود.

**** به محض ورود خون بداخل سرنگ یا لوله خلاء باید رگ‌بند (تورنیکه) باز شود.***

در صورت استفاده از لوله خلاء باید تمهیدات زیر صورت گیرد :

●● حتی‌الامکان سوزن در رگ ثابت نگه‌داشته شده و اولین لوله با فشار به سوزن مرتبط شود.

●● لـولـه‌ها باید تا خاتمه مکش از خون پر شوند. پس از وقفه جریان خون اولین لوله از سوزن جدا شده و لوله‌های بعدی به سوزن متصل می‌شوند.

●● لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد و خون باید بلافاصله پس از پرشدن مخلوط شوند (با۱۰-۵ مرتبه سروته نمودن). جهت جلوگیری از همولیز نباید لوله‌ها به شدت مخلوط گردند.

پس از جاری شدن روان خون به داخل سرنگ یا لوله‌های خلاء بیمار باید مشت خود را باز کند.

۱۰- دفع سر سوزن

سر سوزن‌های آلوده ***بدون گذاشتن درپوش سرسوزن*** باید در ظروف ایمن، دفع گردند. سپس نمونه خون به آرامی در ظروف مربوطه تخلیه شود.

۱۱- تخلیه خون

نمونه‌هایی که در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد ریخته می‌شوند باید بلافاصله و به آرامی ۵ تا ۱۰ بار مخلوط شوند. در صورتی‌که نمونه در لوله بدون ماده ضد انعقاد ریخته می‌شود باید به آرامی در جدار داخلی لوله تخلیه گردد.

۱۲- اقدامات پس از نمونه‌گیری

پس از خاتمه نمونه‌گیری، باید موضع از نظر بندآمدن خون‌ریزی و یا به‌وجود آمدن هماتوم کنترل گردد.

۱۳- برچسب‌گذاری ظرف حاوی نمونه

بلافاصله پس از اتمام نمونه‌گیری باید برچسب دارای اطلاعات زیر را بر روی لوله‌ها و ظروف حاوی نمونه خون بیمار الصاق نمود:

- نام، نام خانوادگی بیمار، شماره شناسایی، تاریخ، زمان نمونه‌گیری (بخصوص در آزمایش‌های ردیابی دوز درمانی داروها TDM)، نام فرد خون‌گیر

خون‌گیری مویرگی – نمونه‌گیری از طریق سوراخ کردن پوست (Skin Puncture)

خون‌گیری مویرگی در نوزادان، اطفـــال و بزرگسالان در شرایط خاص نظیر بیماران با سوختگی وسیع، بیماران بسیار چاق، بیماران مستعد به ترومبوز و بیماران مسن یا سایر بیمارانی که وریدهای سطحی آن‌ها قابل دسترسی نبوده یا بسیار شکننده است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

- **نواحی مناسب جهت سوراخ کردن پوست و جمع‌آوری نمونه:**

- بند انتهایی انگشتان دست
- سطح داخلی و خارجی پاشنه پا

- ***در نوزادان کمتر از یک‌سال معمولا خون‌گیری از پاشنه پا انجام می‌گیرد.***
- ***در اطفال و بـزرگســالان معمولا از سطـح داخــلی بند آخــر انگشتان (انگشت ســوم یـا چهــارم) خون‌گیری صورت می‌گیرد. سطح جانبی و نوک انگشتان مناسب نمی‌باشند.***

از نواحی زیر *نباید* خون‌گیری صورت گیرد:

۱) نرمه گوش
۲) ناحیه مرکزی پاشنه پا در نوزادان
۳) انگشتان (دست و پا) نوزادان و اطفال کمتر از یک‌سال

نواحی متورم یا مناطقی که قبلا جهت نمونه‌گیری سوراخ شده‌اند(به‌دلیل تجمع مایع بافتی)

- **روش کار**

موضع مورد نظر توسط محلول ایزوپروپانول ۷۰٪ (یا اتانول ۷۰٪) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، خون-گیری به‌وسیله لانست استریل انجام می‌شود. قابل ذکر است که باید اولین قطره خون را به‌وسیله گاز پاک کرده و از قطرات بعدی استفاده نمود.

آماده‌سازی نمونه خون

سرم یا پلاسما باید در کوتاه‌ترین زمان به‌دنبال نمونه‌گیری از سلول‌های خونی جدا گردد. حداکثر زمان مجاز جهت جداسازی سرم یا پلاسما ۲ ساعت پس از نمونه‌گیری پیشنهاد می‌گردد. قابل ذکر است که درخصوص اندازه‌گیری ترکیباتی نظیر پتاسیم، هورمون‌های کورتیکواستروئیدی، کورتیزول، کاتکولامین‌ها، اسید لاکتیک و هموسیستین این زمان باید کمتر از ۲ ساعت باشد. قابل ذکر است که درجه حرارت محیط نیز بر پایداری برخی مواد تاثیر می‌گذارد.

آماده‌سازی نمونه در طی سه مرحله انجام می‌گیرد: مرحله پیش از سانتریفیوژ، مرحله سانتریفیوژ، مرحله پس از سانتریفیوژ.

• مرحله پیش از سانتریفیوژ

برای اکثر روش‌های اندازه‌گیری مواد در خون به‌جز اندازه‌گیری گازهای خون و آمونیاک، استفاده از سرم یا پلاسما ارجحیت دارد.

•• **تهیه سرم:** نمونه خون پس از جمع‌آوری (در ظروف در بسته)، باید جهت جداسازی و سانتریفیوژ مراحل لخته شدن را طی نماید که بهتر است این مرحله با طی زمان و به‌طور خودبخود صورت گیرد. عمل لخته شدن به‌طور طبیعی در دمای اتاق (۲۵-۲۲°C) پس از ۶۰-۳۰ دقیقه کامل می‌گردد. در صورتی که بیمار داروهای ضد انعقاد مصرف نماید، زمان لخته شدن طولانی‌تر بوده و اگر نمونه در شرایط سرما قرار گیرد (۸-۲°C) نیز این عمل به تاخیر می‌افتد. هم‌چنین اگر زمان لازم جهت کامل شدن مراحل تشکیل لخته کافی نباشد، تشکیل رشته‌های ظریف فیبرین ممکن است سبب ایجاد خطا در نتایج بسیاری از دستگاه‌های خودکار بیوشیمی گردد. جهت تسریع در عمل لخته شدن می‌توان از لوله‌های جمع‌آوری سرم که حاوی فعال-کننده یا تسریع‌کننده عمل لخته شدن باشد استفاده نمود. به‌طور مثال لوله‌های حاوی افزودنی نظیر سم مار، زمان تشکیل لخته را به ۵-۲ دقیقه، ترومبین به ۵ دقیقه، سیلیکا و پارتیکل‌های شیشه به حدود ۳۰-۱۵دقیقه می‌رسانند. (استفاده از اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی جهت جداسازی لخته از دیواره لوله پیشنهاد نمی‌گردد)

•• **تهیه پلاسما:** لوله‌های حاوی خون به همراه مواد افزودنی به‌جز سیترات سدیم باید پس از نمونه‌گیری به آرامی برای حداقل ۱۰-۵ بار جهت مخلوط شدن سر و ته گردند (به‌جز موارد خاص که باید مطابق دستورالعمل سازنده لوله عمل گردد). لوله‌های حاوی سیترات سدیم و خون باید ۴-۳ مرتبه سر و ته گردند.

•• **سرد نمودن:** بعضی نمونه‌ها باید تا قبل از عمل سانتریفیوژ و جداسازی در سرما نگه‌داری شوند. سرد کردن نمونه، متابولیسم سلول‌های خونی را مهار نموده و سبب پایداری اجزای حساس به حرارت می‌گردد. جهت سرد نمودن، نمونه باید سریعا در یخ خرد شده یا مخلوطی از آب و یخ قرار گیرد (استفاده از تکه‌های بزرگ یخ به‌دلیل تماس ناکافی بین نمونه و یخ قابل قبول نمی‌باشد). یخ باید کاملا اطراف سطح خون درون لوله را احاطه کند.

نکته: قرار دادن نمونه خون بیش از دو ساعت در سرما سبب افزایش کاذب پتاسیم می‌گردد. سرما سبب مهار گلیکولیز شده، لذا انرژی جهت پمپ پتاسیم به داخل سلول ایجاد نمی‌گردد و بدنبال آن پتاسیم از سلول‌ها به بیرون نشت می‌کند. نمونه جهت اندازه‌گیری الکترولیت‌ها نیز نباید تا قبل از سانتریفیوژ و انجام آزمایش در دمای ۳۹C-۸ قرار گیرد.

نمونه خون جهت اندازه‌گیری ترکیباتی نظیر کاتکول آمین‌ها، آمونیاک، اسید لاکتیک، پیروات، گاسترین، هورمون پاراتیروئید، فعالیت رنین پلاسما و اسید فسفاتاز، باید پس از جمع‌آوری در سرما نگه‌داری شود.

•• **نگه‌دارنده‌ها و مهارکننده‌های متابولیک:** بعضی افزودنی‌ها می‌توانند از تغییرات غلظت مواد در نمونه با گذشت زمان جلوگیری نمایند. مواد آنتی گلیکولیتیک نظیر فلوراید می‌توانند گلوگز را در حضور سلول‌های خونی به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۴-۲۲°C) و تا ۴۸ ساعت در دمای یخچال (۸-۲°C) پایدار نگه‌دارند. به‌دلیل حساسیت اندازه‌گیری گلوگز در نوزادان و اطفال می‌توان از مواد افزودنی آنتی گلیکولیتیک استفاده نمود. هم‌چنین جهت اندازه‌گیری لاکتات باید از فلوراید سدیم یا اگزالات پتاسیم استفاده نمود.

انتقال

انتقال نمونه‌های بیولوژیک نظیر خون، ادرار و سایر مایعات بدن از محل نمونه‌گیری به آزمایشگاه جزء مهمی از چرخه‌کاری در آزمایشگاه می‌باشد. در مورد نمونه‌های خون روند انتقال ۱/۳ زمان چرخه کاری را شامل می‌شود.

❋ جمع‌آوری نمونه در محل آزمایشگاه

•• **زمان:** نمونه‌ها باید در ظروف در بسته مناسب در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال گردند. انتقال نمونه‌ها می‌بایست در شرایط دمای اتاق صورت گیرد، به‌جز نمونه‌هایی که باید با حفظ زنجیره سرد نگه‌داری و منتقل شوند. انتقال سریع نمونه از محل نمونه‌گیری به آزمایشگاه در شرایطی که دمای محل نمونه‌گیری بالاتر از ۲۲°C است از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• **وضعیت لوله:** نمونه‌های خون باید در لوله‌های در پوش‌دار و در وضعیت قائم نگه‌داری گردند. این امر سبب تسریع فرایند انعقاد و هم‌چنین کاهش به هم خوردگی محتوی لوله می‌گردد و احتمال ایجاد همولیز را نیزکاهش می‌دهد.

•• **درپوش:** نمونه‌ها باید در طول مدت انتقال و نگه‌داری در ظروف درپوش‌دار قرار گیرند. عدم وجود درپوش باعث خطا در نتایج بعضی متغیرها به‌دلیل از دست دادن دی اکسید کربن و افزایش PH نظیر کلسیم یونیزه و اسید فسفاتاز (افزایش می-یابند) می‌گردد.
هم‌چنین وجود درپوش خطر ایجاد آئروسل، تبخیر نمونه و آلودگی را نیز کاهش می‌دهد.

•• **همولیز:** حمل و نقل نمونه باید به آرامی صورت گیرد تا امکان آسیب به گلبول‌های قرمز را به حداقل رساند. وجود همولیز در نمونه سبب تداخل با عملکرد برخی دستگاه‌هایی می‌شود که به روش نوری پارامترها را اندازه‌گیری می‌کنند. ترکیبات زیادی در سرم و پلاسما تحت تاثیر همولیز (با منشا خارجی) قرار می‌گیرند که نمونه‌هایی از آن به شرح زیر است:

- پارامترهایی که شدیدا تحت تاثیر همولیز قرار گرفته و افزایش می‌یابند شامل: هموگلوبین پلاسما، آسپارژین امینو ترانسفراز (AST)، پتاسیم، لاکتات دهیدروژناز می‌باشند.
- پارامترهایی که به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر همولیز قرار می‌گیرند شامل: آهن، آلانین امینو ترانسفراز (افزایش می‌یابند) و T4 (کاهش می‌یابد) هستند.
- پارامترهایی که کمتر تحت تاثیر همولیز قرار گرفته ولی امکان افزایش آن‌ها به‌دنبال همولیز وجود دارد شامل: فسفر، پروتئین توتال، آلبومین، منیزیم، کلسیم، و اسید فسفاتاز می‌باشند.

قابل ذکر است پلاسمای حاوی ۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، به رنگ صورتی روشن و پلاسمای حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، به رنگ قرمز است. بالا رفتن بیلی‌روبین در پلاسما ممکن است وجود هموگلوبین را بپوشاند به‌طور مثال غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین ممکن است با چشم غیر مسلح با وجود بیلی‌روبین ۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر قابل رویت نباشد.
وجود همولیز در نمونه خون کامل ممکن است با چشم قابل رویت نباشد لذا پیشنهاد می‌گردد در مواردی که نتایج متغیر مورد اندازه‌گیری بالاتر از محدوده مرجع آن می‌باشد، نمونه مورد آزمایش از نظر وجود همولیز نیز بررسی گردد. (با سانتریفیوژ و بررسی پلاسما)

•• **مجاورت با نور:** نمونه نباید در مقابل نور خورشید قرار گیرد این امر بخصوص در مورد ترکیباتی که به نور خورشید یا اولترا ویوله بسیار حساس هستند نظیر بیلی‌روبین، ویتامین A و B6 و بتا کاروتن بسیار اهمیت دارد. ظرف حاوی این نمونه‌ها جهت محافظت از نور باید در پوششی از کاغذ آلومنییوم پیچیده شده یا درظرف شیشه‌ای قهوه‌ای نگه‌داری شوند.

❋ جمع‌آوری نمونه خارج از محل آزمایشگاه

در صورتی که در مرکزی فقط نمونه‌گیری انجام گیرد، نمونه‌های خون باید حداکثر تا دو ساعت پس از نمونه‌گیری با رعایت تمهیدات لازم نظیر شرایط پایداری متغیرهای مورد آزمایش و رعایت اصول ایمنی، در دمای اتاق (مگر در موارد خاص که نیاز به زنجیره سرد دارد) به آزمایشگاه منتقل شوند. در صورتی که نتوان در محدوده زمانی فوق، نمونه خون را ارسال نمود باید پس از جداسازی سرم و پلاسما، آن را دردمای ۲°C-۸ نگه‌داری و با رعایت پایداری نمونه به آزمایشگاه ارسال کرد.

❋ دریافت نمونه

نمونه خون پس از دریافت و کامل شدن مرحله لخته، جهت سانتریفیوژ آماده می‌گردد. در صورتی کـه خـون در لـولـه فعـال-کننـده لختـه جمـع‌آوری شـده بـاشد در طی مدت ۳۰-۵ دقیقه پس از نمونه‌گیری می‌تواند سانتریفیوژ گردد. نمونه در لوله حاوی ماده ضد انعقاد سریعا قابل سانتریفیوژ می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری بعضی متغیرها در خون نظیر سرب، سیکلوسپورین و هموگلوبین گلیکوزیله، خون کامل مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولی اگر نمونه اشتباها سانتریفیوژ شود مشکلی ایجاد نشده و می‌توان آن را با همان شرایط به بخش مربوطه ارسال نمود.

نمونه‌هایی که باید در شرایط سرما نگه‌داری شوند (۸-۲°C) تا آماده شدن جهت سانتریفیوژ باید در این درجه حرارت باقی بمانند. سانتریفیوژ یخچال‌دار در این خصوص پیشنهاد می‌گردد.

❋ معیارهای رد نمونه خون

- مشخصات ناکافی از بیمار یا نوع آزمایش (نظیر عدم وجود برچسب یا برچسب با اطلاعات ناقص)
- حجم ناکافی
- نشت نمونه به خارج از ظرف
- استفاده از لوله نامناسب جمع‌آوری نمونه
- ضد انعقاد نامناسب (مثلا فلوراید سدیم در اندازه‌گیری اوره با روش اوره‌آز تداخل می‌کند)
- ترتیب نادرست جمع‌آوری نمونه در صورتی که در طی یک بار نمونه‌گیری از لوله‌های متعدد خلاء استفاده شود.
- وجود همولیز یا لیپمی
- نگه‌داری و انتقال نمونه در دمای نامناسب
- وجود لخته در نمونه‌های جمع‌آوری شده با ماده ضد انعقاد
- عدم تطابق برگه درخواست آزمایش با نوع نمونه و مشخصات آن

● مرحله سانتریفیوژ

همان‌طور که ذکر شد استفاده از اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی جهت جداسازی لخته از دیواره لوله پیشنهاد نمی‌گردد. در صورت استفاده باید احتیاط لازم برای جلوگیری از ایجاد همولیز و تولید آئروسل صورت گیرد. هم‌چنین باید در تمام مراحل جداسازی نمونه، رعایت اصول ایمنی و استفاده از وسایل حفاظت فردی صورت گیرد. قابل ذکر است که درب لوله‌ها در طی سانتریفیوژ حتما باید بسته باشد.

امروزه با تنوع سانتریفیوژها از نظر قسمت گردان (Rotor)، سر (Head)، شعاع موثر و قطر داخلی دیگر از اصطلاح Round Per Minute) استفاده نمی‌شود و نیروی نسبی سانتریفیوژ (Relative Centrifugal Force) یا RCF جایگزین آن شده است.

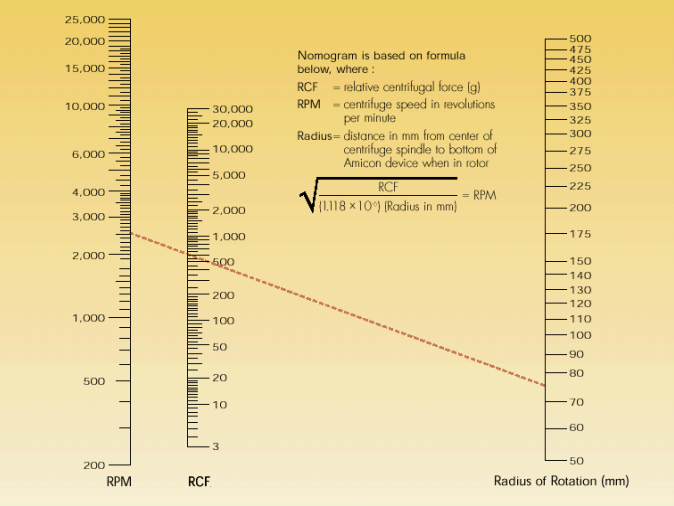
$$RCF = 1.118\times10^{-5}\times r\times(RPM)^2$$

r : شعاع گردان (سانتی متر)

شعاع موثر بیشترین فاصله افقی از محور گردان تا انتهای مایع موجود در لوله می‌باشد.

RPM : سرعت گردان (تعداد دور در دقیقه)

می‌توان بـرای محاسبه نیروی نسبی سانتریفیوژ به‌جای استفاده از فرمول بالا با استفاده از نمودار ۱-۳ سانتریفیوژ با توجه به شعاع و میزان دور سانتریفیوژ، نیروی نسبی سانتریفیوژ را به‌دست آورد.



نمودار ۱-۳: نموگرام تعیین نیروی نسبی سانتریفیوژ به کمک شعاع و میزان دور (PPM)

برای مطالعه بیشتر به دستورالعمل فنی سانتریفیوژ (فصل دهم – جلد دوم) مراجعه شود.

قابل ذکر است جهت برخی فاکتورها که به دما حساس هستند، باید از سانتریفیوژهایی‌که دمای آن‌ها قابل کنترل است استفاده نمود. به‌طور مثال ترکیباتی نظیر ACTH و cAMP به گرما حساس هستند و انتقال و سانتریفیوز آن‌ها نیز باید در دمای ۴°C صورت گیرد.

نکته: در صورتی‌که اندازه‌گیری پتاسیم هم به همراه ترکیباتی که حساس به دما هستند درخواست شده باشد باید توجه نمود که نمونه مذکور سریعا از سانتریفیوژ خارج شود (دمای پایین‌تر از ۱۵°C سبب افزایش کاذب پتاسیم پس از ۲ ساعت می‌گردد). لازم به ذکر است جهت اندازه‌گیری پتاسیم نمونه نباید بیش از یک‌بار سانتریفیوژ گردد.

*** زمان مورد نیاز جهت سانتریفیوژ نمونه**

- **تهیه سرم و پلاسما:** نمونه در ظرف درپوش‌دار باید به مدت ۱۵-۱۰دقیقه در ۱۰۰۰-۱۲۰۰g سانتریفیوژ شود. در صورتی‌که آزمایش تا ۴ ساعت بعد از جداسازی سرم انجام نگیرد، سرم یا پلاسما باید در دمای ۴°C-۶ نگه‌داری گردد.
- **تهیه پلاسما جهت آزمون‌های انعقادی:** نمونه در ظرف درپوش‌دار باید به مدت ۱۵دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ گردد.
-

● مرحله پس از سانتریفیوژ

- **نگه‌داری نمونه**

پلاسما و سرم حداکثر تا ۸ ساعت پس از جداسازی در دمای اتاق قابل نگه‌داری است. در صورتی‌که سنجش مورد نظر تا ۸ ساعت صورت نگیرد نمونه باید در یخچال نگه‌داری گردد.

درصورتی‌که امکان انجام آزمایش تا ۴۸ ساعت مقدور نباشد یا در صورت نیاز به نگه‌داری طولانی‌تر، سرم یا پلاسما باید در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شود.

نکته: باید از آب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌های فریز شده جدا پرهیز گردد، زیرا این امر سبب از بین رفتن بعضی ترکیبات در سرم یا پلاسما می‌شود. استفاده از فریزرهای بدون برفک نیز جهت نگه‌داری نمونه پیشنهاد نمی‌گردد.

در صورت استفاده از مواد آنتی گلیگولیتیک (نظیر فلوراید) گلوگز پلاسما تا ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C و تا ۴۸ ساعت در دمای ۸-۲°C پایدار می‌ماند. (حتی در صورت عدم جداسازی پلاسما از سلول‌ها) قابل ذکر است در صورتی‌که گلبول‌های قرمز، پلاکت و گلبول‌های سفید نمونه بالاتر از حد طبیعی باشند، اثر گلیکولیتیک این مواد کاهش می‌یابد. به‌دلیل مشکل بودن مهار گلیکولیز در نوزادان، باید پلاسما در اسرع وقت از سلول‌ها جدا گردد.

- در صورت استفاده از لوله‌های جمع‌آوری خلاء دارای ژل جداکننده همراه با افزودنی یا فعال کننده لخته، باید ملاحظات زیر صورت گیرد:

•• به محض جمع‌آوری خون جهت سرعت بخشیدن، تکمیل عمل لخته شدن و روند ضد انعقاد، لوله‌ها باید ۱۰-۵ بار تکان داده شوند.

•• نیروی نسبی سانتریفیوژ و زمان لازم جهت جداسازی سرم یا پلاسما بسته به کارخانه سازنده ممکن است متفاوت باشد.

•• به‌طور کلی می‌توان سرم را در لوله‌های محتوی ژل تا ۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگه‌داری نمود، ولی باید قوام ژل به‌طور چشمی نیز بررسی گردد.

تداخلات:

از لوله‌های جمع‌آوری خون حاوی ژل جداکننده جهت اندازه‌گیری میزان پروژسترون، داروهای سه حلقه‌ای ضدافسردگی، اندازه‌گیری سطح دارویی و آزمون‌های ایمونوهماتولوژی (بانک خون) نباید استفاده شود.

اسمیر خون محیطی

تهیه گستره خون محیطی باید توسط کارکنان آموزش دیده صورت گیرد. تهیه گستره با استفاده از نمونه تهیه شده از نوک انگشت، پاشنه پا یا نمونه همراه با ماده ضد انعقاد EDTA صورت می‌گیرد.

در صورت استفاده از نمونه همراه با ماده ضد انعقاد، باید گسترش خون محیطی حداکثر تا یک ساعت پس از نمونه گیری تهیه گردد.

• گسترش ضخیم

۱- بند اول انگشت سوم یا چهارم در بزرگسالان و یا پاشنه پا در نوزادان (مراجعه به نمونه‌گیری مویرگی) ضد عفونی شده و با لانست یک‌بار مصرف موضع سوراخ می‌گردد.

۲- یک یا دو قطره خون را با مرکز لام مماس می‌کنیم، باید توجه شود که لام با پوست تماس پیدا نکند.

۳- با گوشه یک لام دیگر یا اپلیکاتور قطره خون را به‌طور یکنواخت پخش کرده تا دایره‌ای به قطر حدود ۱سانتی‌متر ایجاد شود. گسترش باید به سرعت و با ضخامت یکنواخت تهیه گردد.

۴- لام را در وضعیت افقی قرار داده تا در حرارت محیط (۲۵°C) خشک شود. برای تسریع در عمل خشک شدن نباید از شعله یا منبع دیگر حرارتی استفاده نمود.

نکته:

•• ضخامت گسترش باید به گونه‌ای باشد که نوشته‌های روزنامه از زیر آن به سختی خوانده شود.

•• گسترش ضخیم نباید به‌وسیله مواد تثبیت‌کننده ثابت گردد.

•• گسترش ضخیم ممکن است از بافی کوت نیز تهیه گردد (با استفاده از نمونه خون در ماده ضد انعقاد)

• گسترش نازک

۱- یک قطره خون (حدود ۰/۰۵ میلی‌لیتر) به فاصله حدود ۲ سانتی‌متر از انتهای لام قرار داده شود. باید توجه شود که لام با پوست دست بیمار تماس پیدا نکند.

۲- لام بر روی سطح افقی و صاف قرار داده می‌شود.

۳- با یک لام تمیز دیگر (ترجیحا لام صیقلی) با زاویه ۴۵-۴۰°C با حرکت سریع بر روی قطره خون موجود بر روی لام اول کشیده شود (نظیر تهیه گسترش خون در آزمون CBC).

۴- گسترش باید سریعا در حرارت محیط خشک شود.

۵- گسترش خشک شده باید در محلول متانول به مدت چند ثانیه تثبیت گردد.

۶- گسترش نازک باید به گونه‌ای تهیه شود که در یک انتها ضخیم و در انتهای دیگر به حدی نازک باشد تا گلبول‌های قرمز با هم همپوشانی نداشته باشند.

نکته:

- ***باید از لام شیشه‌ای تمیز، بدون گرد و غبار و عاری از چربی استفاده نمود. علت ایجاد ناهمواری و یا حفراتی در گسترش چرب بودن لام یا کثیف بودن یا ناهموار بودن لبه لام دوم می‌باشد.***
- ***هر دو گسترش نیز می‌تواند بر روی یک لام تهیه گردد، در این‌صورت باید فضایی بین دو گسترش وجود داشته باشد به‌طوری که بتوان گسترش نازک را بدون آن‌که گسترش ضخیم را متاثر سازد تثبیت نمود.***
- ***مشخصات بیمار باید باید با مداد سربی یا ماژیک غیر قابل شست‌وشو در ناحیه ضخیم گسترس نازک نوشته شود.***
- ***برای تسریع در عمل خشک شدن می‌توان از پنکه استفاده نمود (نباید از شعله یا منابع دیگر حرارتی استفاده شود).***
- ***در مناطقی که رطوبت بالا است استفاده از گرمخانه ۳۵ ℃ جهت خشک نمودن لام‌ها پیشنهاد می‌گردد.***

ادرار

نمونه ادرار برای بررسی‌های شیمیایی، سلول‌شناسی و میکروب‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نحوه نمونه‌گیری و ظروف جمع‌آوری ادرار از عوامل مهم در کیفیت نمونه می‌باشد.

نمونه ادرار باید در ظرف تمیز دهان گشاد با قطر حداقل ۱۰سانتی‌متر، با اندازه مناسب و غیر قابل نشت، جمع‌آوری گردد. بهتر است ظرف جمع‌آوری ادرار یک‌بار مصرف بوده و درغیر این‌صورت عاری از هرگونه آلودگی با مواد شوینده باشد. قابل ذکر است که نمونه ادرار نباید به مدفوع آلوده باشد.

جهت کشت ادرار ظرف نمونه باید حتما استریل باشد. برای نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه‌های ادراری استفاده شود.

جهت بررسی‌های معمول و میکروبیولوژیک نمونه ادرار باید حداکثر تا دو ساعت پس از جمع‌آوری (در دمای اتاق) مورد بررسی قرار گیرد. پس از این مدت ترکیبات شیمیایی ادرار تغییر کرده و عناصر تشکیل دهنده آن شروع به تخریب می‌کنند. سیلندرها، گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید در نمونه‌های با وزن مخصوص پایین و PH قلیایی بسیار مستعد لیز هستند.

هنگامی که ارزیابی سلولی سدیمان ادراری مدنظر است باید مراحل آماده‌سازی ادرار هرچه سریع‌تر صورت گیرد. جهت تهیه رسوب ادرار باید نمونه در ظروف درپوش‌دار به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفیوژ گردد.

در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به سرعت به آزمایشگاه منتقل نمود و آزمایش کرد می‌توان آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲°C نگه‌داری کرده و یا می‌توان از نگه‌دارنده‌های باکتریواستاتیک نیز استفاده نمود.

ظرف محتوی نمونه باید به‌درستی برچسب‌گذاری شود، اطلاعات مورد نیاز شامل: نام بیمار، زمان نمونه‌گیری، نام نگه‌دارنده، در موارد خاص ذکر نوع نمونه (کاتتر .....) می‌باشد. هم‌چنین در صورتی‌که نمونه از محل دیگری ارسال گردد باید نحوه نگه-داری و زمان دریافت نیز ذکر گردد.

حداقل حجم مورد نیاز جهت بررسی‌های معمول کمی و کیفی ادرار به‌طور متوسط ۱۲ میلی‌لیتر است، البته در اطفال و نوزادان ممکن است حجم کمتر نیز مورد بررسی قرار گیرد، ولی باید حتما در برگه گزارش ذکر گردد.

- **انواع مختلف جمع‌آوری ادرار و موارد استفاده آن**

۱- ادرار اتفاقی جهت بررسی شیمیایی کیفی و نیمه کمی

۲- اولین ادرار صبحگاهی (ادرار ۸ ساعته) جهت بررسی اجزای سلولی، سیلندر و کست

۳- دومین ادرار صبحگاهی (۷-۱۰صبح) جهت بررسی‌های کمی

۴- ادرار با زمان مشخص مثلا ادرار ۲۴ ساعته جهت بررسی‌های کمی

۵- ادرار تمیز (ادرار میانی، کاتتر و سوپراپوبیک)

❋ ادرار اتفاقی

این نمونه جهت آزمون غربالگری روزمره مورد استفاده قرار می‌گیرد و در هر موقع از روز قابل جمع‌آوری می‌باشد، ولی زمان نمونه‌گیری باید روی ظرف درج گردد. بهتر است قبل از جمع‌آوری ادرار فرد چند ساعت ادرار خود را تخلیه نکرده باشد. برای این منظور اولین ادرار صبحگاهی به‌دلیل غلظت مناسب و PH پایین مناسب‌تر است.

❋ ادرار صبح‌گاهی (ادرار ۸ ساعته)

این نمونه معمولا در اول صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد.

این نمونه جهت بررسی پروتئین‌اوری اورتواستاتیک مناسب است. ابتدا شب قبل از خواب ادرار تخلیه شده و نمونه صبح پس از بیدار شدن فرد جمع‌آوری می‌گردد. در صورت تخلیه ادرار در طول شب، باید در ظرف جمع‌آوری نمونه ریخته شود.

❋ ادرار زمان‌دار

این نمونه در یک زمان مشخص در طول شبانه روز تهیه می‌گردد، مثلا نمونه ناشتا، دو ساعت پس از غذا یا بلافاصله پس از ماساژ پروستات

❋ ادرار ۲۴ ساعته

به‌دلیل تغییرات دوره‌ای ترشح مواد در ادرار، در بعضی مواقع نیاز است که ادرار ۲۴ ساعته جمع‌آوری گردد. به‌عنوان نمونه می‌توان از کاتکول آمین‌ها، ۱۷هیدروکسی استروئید و الکترولیت‌ها نام برد که پایین‌ترین غلظت آن‌ها در صبح و بالاترین غلظت این ترکیبات در ظهر یا کمی پس از آن می‌باشد.

●● **جمع آوری نمونه:** ظرف نمونه باید پلاستیکی و دهان گشاد به گنجایش تقریبی ۳ لیتر باشد.

جهت جمع‌آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته ابتدا اولین ادرار صبحگاهی دور ریخته شده و در طی ۲۴ ساعت بعدی ادرار در ظرف نمونه‌گیری جمع‌آوری می‌شود به‌طوری که آخرین نمونه جمع‌آوری شده، اولین نمونه صبحگاهی روز بعد (در همان ساعت اولین نمونه تخلیه شده روز قبل) باشد.

بر روی برچسب روی ظرف محتوی نمونه علاوه بر نام و نام خانوادگی باید تاریخ، ساعت شروع و پایان نمونه‌گیری نیز یاداشت گردد و در صورت استفاده از ماده نگه‌دارنده درج نام ماده نیز ضروری است.

در طول مدت جمع‌آوری، ظرف نمونه باید در یخچال یا درون یخ نگه‌داری شود.

ممکن است جهت ادرار ۲۴ ساعته از مواد نگه‌دارنده استفاده گردد که با توجه به خطر زیستی این مواد، باید هشدارهای لازم به بیمار داده شود.

❋ ادرار تمیز

جهت بررسی‌های باکتری‌شناسی از نمونه ادرار تمیز استفاده می‌شود.

●● **نحوه جمع‌آوری نمونه**

بیمار ابتدا دست‌های خود را با آب و صابون شسته و سپس ناحیه تناسلی خود را با پنبه آغشته به آب و صابون تمیز می‌نماید، بخش اول ادرار را دور ریخته و بخش میانی ادرار را با رعایت شرایط استریل در درون ظرف جمع‌آوری ادرار می‌ریزد و سپس بقیه ادرار را دور می‌ریزد.

●● ادرار تهیه شده توسط کاتتر و فوق عانه (سوپرا پوبیک) نیز از روش‌هایی هستند که جهت جمع‌آوری ادرار استریل در مواقع خاص و با در خواست پزشک تهیه می‌شوند.

●● جهت نمونه‌گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه جمع‌آوری ادرار استفاده نمود. در صورتی‌که بیمار در خواست کشت ادرار نیز داشته باشد، باید نواحی شرمگاهی و پرینه‌آل قبل از وصل کردن کیسه ادرار با آب و صابون شسته شود. قابل ذکر است که کیسه ادرار باید هر ۱۵ دقیقه کنترل شده و پس از جمع‌آوری، ادرار باید در ظرف دیگری نگه‌داری شود.

• مواد نگه‌دارنده ادرار

مواد نگه‌دارنده جهت نگه‌داری ادرار بیش از ۲ ساعت، بررسی ترکیبات ناپایدار در ادرار و پایداری نمونه جهت مطالعات میکروبیولوژیک کاربرد دارد.

نگه‌دارنده‌های رایج اسید استیک، اسید بوریک و اسید کلریدریک ۶ نرمال می‌باشند. این ترکیبات توکسیک بوده و دارای خطر زیستی می‌باشند. هم‌چنین به‌دلیل امکان پاشیده شدن ادرار به هنگام تخلیه در ظرف، بهتر است ابتدا نمونه در ظرف دیگری جمع‌آوری شده و سپس به ظرف اصلی حاوی ماده نگه‌دارنده منتقل گردد.

➢ نگه‌داری و انتقال نمونه

- ➢ جهت انتقال نمونه باید درب ظرف کاملا محکم باشد تا امکان نشت نمونه به خارج از ظرف و محیط اطراف به حداقل برسد (در صورت امکان جهت انتقال می‌توان ظرف نمونه را درون ظرفی دیگری قرارداد).
- ➢ نمونه ادرار باید در سریع‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و حداکثر در ظرف ۲ ساعت در دمای اتاق بررسی گردد. در غیر این‌صورت باید نمونه پس از جمع‌آوری در یخچال نگه‌داری شود (دمای $2^{\circ}C$-۸).
- ➢ در بررسی‌های میکروبیولوژیک در صورتی‌که نتوان نمونه را به آزمایشگاه منتقل نمود و مورد بررسی قرارداد تمهیدات زیر باید صورت گیرد:
- ➢ •• نمونه را می‌توان به مدت ۲۴ ساعت در دمای $2^{\circ}C$-۸ تا قبل از کشت نگه‌داری نمود.
- ➢ •• می‌توان قسمتی از نمونه ادرار را جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در ظرف دیگری که حاوی نگه‌دارنده باکتریو استاتیک است، نگه‌داری نمود.

مدفوع

- ➢ مدفوع نمونه مناسبی جهت تشخیص عوامل پاتوژن مولد اسهال باکتریایی، ویروسی و انگلی است. نمونه‌گیری در زمان مناسب (عوامل ویروسی تا ۴۸ ساعت و عوامل باکتریایی تا ۴ روز از زمان شروع اسهال)، نحوه انتقال نمونه و شرایط بیمار در هنگام نمونه‌گیری از عواملی هستند که رعایت آن‌ها در شناسایی عامل پاتوژن بسیار کمک‌کننده است. جهت جمع‌آوری نمونه مدفوع باید مواردی را در نظر داشت که به برخی از آن‌ها در زیر اشاره می‌گردد:
- ➢ •• بیمار نباید از ۱۵ روز قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک (نظیر تتراسایکلین و سولفانامید)، داروهای ضد تک‌تاخته، بیسموت، سولفات باریم، ترکیبات کائولین، روغن کرچک، هیدروکسید منیزیم یا هرگونه داروی ملین مصرف کرده باشد.
- ➢ •• تعداد دفعات نمونه‌گیری بر اساس درخواست پزشک می‌باشد.
- ➢ •• در صورت مشکوک بودن به عوامل باکتریایی سه نمونه در فاصله سه روز و در خصوص عوامل انگلی ۳ نمونه که در طول ۱۰ روز جمع‌آوری شده مناسب است.
- ➢ •• نباید در یک روز بیش از یک نوبت نمونه از بیمار گرفته شود.
- ➢ •• نمونه‌گیری در بیمارانی که بیش از سه روز بستری شده‌اند توصیه نمی‌شود.
- ➢ •• در نوزادان و اطفال می‌توان از سواپ رکتال در محیط انتقالی استفاده نمود ولی این کار معمولا برای تشخیص ویروس‌ها و عوامل انگلی پیشنهاد نمی‌شود.

• نمونه‌گیری جهت عوامل باکتریایی مولد اسهال

* **نمونه مدفوع:** حداقل ۵ گرم مدفوع باید در ظرف در پیچ‌دار تمیز، عاری از مواد ضدعفونی‌کننده و یا شوینده جمع‌آوری گردد.

*** سواپ مقعدی:** سواپ را با فروبردن در محیط انتقالی سترون، مرطوب کرده به اندازه ۲-۳ سانتی‌متر در داخل اسفنگتر رکتوم فرو برده و بچرخانید. سواب را بیرون کشیده پس از اطمینان از آغشتگی به مدفوع، سریعا به داخل محیط انتقال (کری بلر) فرو برید. سپس لوله‌های انتقال را در یخچال یا یخدان قرار دهید.
در موارد اسهال ناشی از باکتری‌های مهاجم مانند شیگلا، ساییدن سواپ به مخاط انتهایی روده جهت جمع‌آوری نمونه بسیار مهم است.

*** سواپ مدفوع:** در صورت لزوم به نگه‌داری نمونه مدفوع بیش از ۲ ساعت، مقدار اندکی از مدفوع و هرگونه بلغم یا تکه‌های مخاط پوششی روده را با فروکردن سواپ سر پنبه‌ای یا سر پلی‌استری به‌درون مدفوع سریعا به لوله حاوی محیط انتقالی تلقیح کنید و در یخچال یا یخدان قرار دهید.

• محیط‌های انتقالی

•• کری بلر: این محیط برای انتقال بسیاری از عوامل بیماری‌زا کاربرد دارد. این محیط نیمه جامد بوده، حمل و نقل آن آسان و پس از تهیه تا یکسال در دمای اتاق قابل نگه‌داری است (به شرطی که حجم آن کاهش نیافته، علایم آلودگی و تغییر رنگ در آن مشاهده نگردد).

•• آب پپتونه قلیایی (Alkalane Peptone Water=APW): این محیط را می‌توان را برای انتقال ویبریو استفاده نمود ولی این محیط نسبت به کری بلر برتری ندارد و فقط در صورت عدم دسترسی به محیط کری بلر باید مورد استفاده قرار گیرد (در صورتی که کشت بیش از ۶ ساعت از زمان نمونه‌گیری به تعویق بیافتد نباید از این محیط استفاده گردد). محیط فوق در دمای ۴°C تا ۶ ماه قابل نگه‌داری است.

•• سالین گلیسرول بافره (Buffered Glycerol Saline=BGS): این محیط برای شیگلا مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای انتقال ویبریو مناسب نمی‌باشد. این محیط مایع بوده، لذا در حمل آن باید دقت شود. هم‌چنین تا ۱ ماه پس از تهیه قابل استفاده است.

➢ نگه‌داری:

•• نمونه‌های مدفوع حداکثر تا ۲ ساعت در یخچال قابل نگه‌داری است. نمونه‌هایی را که نمی‌توان به فاصله ۲ ساعت از نمونه-گیری کشت داد، باید در محیط انتقالی قرار داده و سریعا در یخچال نگه‌داری نمود.

•• محیط انتقالی حاوی سواپ مدفوع یا مقعد را می‌توان حداکثر ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگه‌داری کرد. در غیر این-صورت این محیط می‌بایست ترجیحا در دمای (۷۰°C-) و یا در صورت عدم دسترسی، در دمای (۲۰°C-) قرار داد (یا حداقل در فریزرهای خانگی نگه‌داری شود).

•• نمونه‌های مدفوع که از بیماران مبتلا به وبا گرفته می‌شود و در محیط انتقالی قرار می‌گیرد نیازی به نگه‌داری در دمای یخچال ندارند، مگر آن که نمونه‌ها در معرض دمای بالا (بیش از ۴۰°C) قرار داشته باشند.

• نمونه‌گیری جهت عوامل انگلی

➢ جمع‌آوری نمونه

•• برای انجام این آزمایش حداقل ۵ گرم مدفوع در ظرف دهان گشاد در پیچدار تمیز و خشک مورد نیاز است (در صورت آبکی بودن مدفوع معادل ۵ سی‌سی).

•• در صورتی که نتوان فاصله زمانی مناسب بین جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش را رعایت نمود باید نمونه در ماده نگه‌دارنده جمع‌آوری شود (یک قسمت مدفوع و سه قسمت ماده نگه‌دارنده فرمالین ۱۰٪).

•• باید توجه داشت که بررسی خصوصیات ظاهری نمونه در نمونه تازه صورت می گیرد.
•• نمونه مدفوع نباید با گرد و خاک، آب و ادرار آلوده گردد، زیرا آلودگی اتفاقی با خاک و آب ممکن است باعث آلودگی نمونه با ارگانیسم‌های دارای زندگی آزاد شود. ادرار نیز سبب تخریب تروفوزوئیت‌ها می‌شود. ترجیحا نباید نمونه از کاسه توالت جمع-آوری گردد.
•• چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته خیلی زود از بین می‌رود، ثبت تاریخ و ساعت نمونه‌گیری ضروری است.

➢ **نگه‌داری**

•• نمونه باید هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در صورت تاخیر بیش از ۲ ساعت، نمونه در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه‌داری شود.

توجه: جهت آزمایش‌های شیمیایی (مانند خون در مدفوع) به ۵۰ گرم مدفوع نیاز می‌باشد.

مایع مغزی نخاعی Cerebro-Spinal Fluid (CSF)

جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی توسط پزشک و به روش پونکسیون نخاعی (Lumber Puncture=LP) و به صورت کاملا استریل انجام می‌گیرد.

معمولا مایع جهت آزمون‌های شیمیایی، میکربیولوژیک و آنالیز سلولی در ۳ تا ۴ لوله جمع آوری می‌شود.

جهت آزمون‌های باکتری‌شناسی نمونه باید در لوله درپوش‌دار و استریل جمع‌آوری گردد. لوله‌ها بر اساس ترتیب جمع‌آوری برچسب‌گذاری می‌شوند (لوله شماره ۱ جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی، لوله شماره ۲ جهت آزمایش‌های میکروب‌شناسی، لوله شماره ۳ جهت بررسی سلولی).

جهت جمع‌آوری نمونه نیازی به ماده ضد انعقاد نمی‌باشد زیرا مایع مغزی نخاعی لخته نمی‌شود، مگر آن که نمونه‌گیری همراه با صدمه باشد (نمونه‌گیری تروماتیک).

الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی نخاعی در جدول ۱-۳ بیان شده است.

جدول ۱-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع مغزی – نخاعی

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز	ملاحظات
آزمون بیوشیمیایی (پروتئین، قند...)	-	۳-۵	لوله شماره ۱ در صورت نمونه گیری تروماتیک شمارش سلولی نیز از لوله شماره ۱صورت می‌گیرد.
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	-	۳-۵	لوله شماره ۲
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی	-	۳-۵	لوله شماره ۳یا ۴
سایر بررسی‌ها (سیتولوژی)	-	۳-۵	لوله شماره ۴

نمونه باید در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردد. دژنراسیون سلولی در طی یک ساعت اتفاق می‌افتد، لذا حداکثر زمان گردش کاری نباید بیش از ۱ ساعت به طول انجامد. نقل و انتقال نمونه در دمای اتاق صورت می‌گیرد. جهت آزمون‌های باکتریولوژیک نباید نمونه در یخچال نگه‌داری شود. از قرار دادن نمونه در معرض نور خورشید و گرما باید خودداری نمود. در صورت نیاز به حمل نمونه تا مسافت دور، استفاده از یخدان ضروری است. در این صورت نمونه تا ۳ ساعت پایدار می‌باشد.

جهت نگه‌داری طولانی مدت، نمونه ابتدا سانتریفیوژ شده پس از جداسازی سلول‌ها، مایع‌رویی در ظرف درپوش‌دار شیشه‌ای یا پلی‌پروپیلن در دمای (۷۰°C-) قابل نگه‌داری است.
جهت مطالعات سیتولوژیک رسوب CSF باید بلافاصله پس از جمع‌آوری به‌وسیله سانتریفیوژ مخصوص (۲۰ دقیقه در ۱۸۰g) تهیه و به آزمایشگاه ارسال شود.

مایع سروز

مایعات سروزی نظیر مایع جنب و صفاقی را می‌توان در یک لوله جمع‌آوری و سپس در محل نمونه‌گیری یا آزمایشگاه به لوله-های مختلف و با حجم‌های کمتر تقسیم نمود. قابل ذکر است که نمونه قبل از تقسیم و شمارش سلولی باید کاملا مخلوط گردد. EDTA ضد انعقاد پیشنهادی در خصوص شمارش و افتراق سلولی است.
جهت شمارش و افتراق سلولی، نمونه‌ها تا ۲۴ ساعت در دمای ۶-۲°C قابل نگه‌داری هستند. در خصوص بررسی‌های میکروبی نمونه باید در ظرف استریل جمع‌آوری گردد.
جهت بررسی سیتولوژی ممکن است نمونه در حجم‌های متفاوت به آزمایشگاه ارسال گردد (۱۰۰-۱۵میلی‌لیتر) ولی حجم پیشنهادی ۵۰ میلی‌لیتر است و نیاز به استفاده از لوله‌های استریل و ماده ضد انعقاد نیز نمی‌باشد. البته می‌توان از هپارین و EDTA هم استفاده کرد.
الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز در جدول ۲-۳ بیان شده است.

جدول ۲-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه و آزمایش بر روی مایع سروز

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم مورد نیاز (میلی لیتر)
اندازه‌گیری پروتئین توتال، لاکتات دهیدروژناز، گلوکز و آمیلاز	هپارین یا بدون ضد انعقاد	۸-۵
کشت و رنگ‌آمیزی گرم	سدیم پلی سولفانات (SPS) یا بدون ضد انعقاد یا ضدانعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۱۰-۸
شمارش سلولی (گلبول قرمز وسفید) و تشخیص افتراقی	EDTA	۱۰-۸
کشت باکتری اسید فست	SPS یا بدون ضد انعقاد یا ضد انعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۵۰-۱۵
رنگ آمیزی PAP- بلوک سلولی	بدون ضدانعقاد، هپارین یا EDTA	۵۰-۱۵

مایعات سروزی باید در اسرع وقت و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شوند.
بررسی‌های سیتولوژی نیز باید هر چه سریع‌تر صورت گیرند، و در صورت نیاز می‌توان نمونه را در دمای ۴°C و بدون ماده تثبیت کننده تا چند روز نگه‌داری نمود.

مایع سینوویال

حجم نمونه جهت بررسی‌های آزمایشگاهی بسته به اندازه مفصل و نوع مایع تجمع یافته در مفصل متفاوت است. معمولا حجم ۳-۵ میلی‌لیتر ایده‌ال است. در مفاصل کوچک ممکن است این مقدار نمونه قابل تهیه نباشد، لذا حجم کمتر نیز قابل قبول است. قابل ذکر است که نمونه قبل از بررسی‌های آزمایشگاهی باید به‌خوبی مخلوط گردد. در بعضی از مراجع ذکر شده که ضد انعقاد لیتیم هپارین و EDTA به‌دلیل ایجاد کریستال در نمونه و امکان اشتباه با کریستال‌های پاتولوژیک، نباید مورد استفاده قرار گیرد. نقل و انتقال نمونه باید در دمای اتاق صورت گیرد.
الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال در جدول ۳-۳ بیان شده است.

جدول ۳-۳: الزامات مورد نیاز جهت تهیه نمونه مایع سینوویال

نوع بررسی	ضد انعقاد	حجم موردنیاز (میلی‌لیتر)	ملاحظات
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی، کریستال‌ها انکلوزیون‌ها	هپارین -EDTA	۳-۵	بر روی حجم کمتر (چندین قطره) نیز قابل انجام است
گلوکز پروتئین	فلوراید یا بدون ضد انعقاد بدون ضد انعقاد	۳-۵ ۳-۵	ترجیحا ۸ ساعت ناشتایی
CH50	بدون ضد انعقاد	۳-۵	در صورت عدم انجام سریع آزمایش نمونه منجمد گردد.
C3,C4	بدون ضد انعقاد یا EDTA		نیاز به ۱ میلی‌لیتر نمونه است.
کشت	SPS، بدون ضدانعقاد یا ضد انعقاد بدون اثرباکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۳-۵	نیاز به لوله استریل است.

نمونه‌های دستگاه تنفسی

بهترین زمان جمع‌آوری نمونه در اکثر عفونت‌های تنفسی در طول ۳ روز اول ایجاد علایم بیماری می‌باشد.
نمونه‌ها بسته به محل عفونت، از قسمت فوقانی و تحتانی دستگاه تنفسی جمع‌آوری می‌شوند. عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی فوقانی (ویروسی و باکتریایی) در نمونه‌های گرفته شده از قسمت نازوفارنژیال گلو و عوامل بیماری‌زای دستگاه تنفسی تحتانی در نمونه خلط قابل بررسی هستند. کشت ارگانیسم‌هایی نظیر لژیونلا مشکل است لذا بهتر است که تشخیص بر اساس شناسایی
آنتی‌ژن‌های جدا شده از ادرار باشد. در صورت شک به التهاب حاد اپیگلوت، نمونه‌گیری از گلو یا فارنژیال نباید صورت گیرد زیرا استفاده از این شیوه ممکن است سبب انسداد شدید تنفسی شود. معمولا التهاب اپیگلوت به‌وسیله رادیوگرافی گردن تایید می‌گردد ولی عوامل اتیولوژیک ایجاد کننده آن ممکن است از کشت خون هم جدا گردند.

● دستگاه تنفسی فوقانی

●● نمونه‌برداری از گلو و لوزه‌ها

از بیمار خواسته می‌شود تا دهان خود را باز نماید و با آبسلانگ زبان وی را به پایین فشار داده، برای مشاهده نواحی ملتهب و اگزودا از چراغ قوه استفاده می‌شود. سواپ استریل داکرونی یا آلژینات کلسیم را چندین بار بر روی نواحی ملتهب و اگزودای حلق می‌کشیم. باید توجه شودکه سواپ با سطح داخلی حفره دهانی تماس پیدا نکند. چنانچه سواب در طی ۲-۱ساعت پس از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار نگیرد در یک لوله استریل درپوش‌دار حاوی محیط انتقالی باکتریایی یا ویروسی قرار داده می‌شود (انتهای سواپ که با دست در تماس بوده باید شکسته شود و درپوش در جای خود قرار گیرد).
جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

●● نمونه‌برداری از انتهای بینی و نازوفارنکس

به‌وسیله یک سواپ انعطاف‌پذیر استریل وارد سوراخ بینی شده و از نازوفارنکس نمونه تهیه گردد. سر بیمار باید کمی به عقب برده شود. در افراد بالغ سواپ را حدود ۵-۶ سانتی‌متر وارد بینی کرده تا مطمئن شوید که سواپ وارد ناحیه خلفی فارنکس

شده است، در همان وضعیت سواب را چند ثانیه نگه‌داشته و سپس به آرامی بچرخانید. از هر سوراخ بینی دو سواپ گرفته می-شود که یکی جهت گسترش مستقیم و دیگری جهت کشت استفاده می‌گردد.

➢ **آسپیراسیون نازوفارنکس**

این روش در کودکان و نوزادان از سواپ راحت‌تر و کارآمدتر است. با کاتتر سیلیکون ترشحات را آسپیره نمایید.

● دستگاه تنفسی تحتانی

➢ **روش جمع‌آوری خلط**

یک نمونه خلط مناسب حاوی مواد ترشحی حاصل از ریه‌ها پس از سرفه عمیق است (نمونه حاوی آب دهان، ترشحات حلق و بینی مناسب نمی‌باشد).

●● زمان نمونه‌گیری

به‌دلیل این‌که تعداد باسیل سل دفع شده در زمان‌های مختلف متفاوت می‌باشد، آزمایش یک نمونه خلط برای تشخیص کفایت نمی‌کند و حتما باید سه نمونه تهیه گردد. برای تهیه نمونه بیمار باید ناشتا باشد. در خصوص تعداد نمونه جمع‌آوری شده جهت سایر عوامل باکتریاییِ یک نمونه کفایت می‌کند ولی درصورت شک به‌وجود عوامل قارچی و عفونت مایکوباکتریوم سه نمونه جداگانه صبحگاهی مناسب می‌باشد.

نمونه اول: در اولین مراجعه بیمار به واحد درمانی تهیه می‌گردد و ظرف جهت نمونه‌گیری دوم نیز تحویل داده می‌شود.

نمونه دوم: خلط صبحگاهی که بیمار قبل از برخاستن از جای خود و به‌صورت ناشتا در منزل تهیه می‌نماید.

نمونه سوم: خلط صبحگاهی که همزمان با مراجعه بیمار برای تحویل نمونه دوم از بیمار گرفته می‌شود.

نمونه باید در ظرف دهان گشاد از جنس پلاستیک قابل سوختن شفاف و محکم با قطر حدود ۷-۵ سانتی‌متر جمع‌آوری گردد (نمونه داخل آن از نظر مقدار و کیفیت قابل رویت بوده و هم‌چنین به‌راحتی سوزانده و معدوم گردد). جهت جلوگیری از نشت خلط از داخل ظرف به بیرون، باید از ظرف در پیچدار استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به ظرف پلاستیکی با مشخصات فوق می‌توان از ظروف شیشه‌ای دهان گشاد در پیچدار استفاده نمود (با رعایت اصول استریلیزاسیون).

➢ **نحوه نمونه‌گیری**

بیمار صبح ناشتا در فضای باز ابتدا یک نفس عمیق کشیده و با سرفه‌های عمیق خلط را درون ظرف (در حالی که ظرف نزدیک لب‌های بیمار قرار دارد) تخلیه می‌کند. سپس درب آن را بسته و در کیسه نایلونی قرار می‌دهد. بهتر است حجم خلط بین ۵-۳ میلی‌لیتر باشد.

در صورتی که بیمار نتواند با سرفه کردن برای انجام آزمایش، نمونه خلط بدهد باید به روش زیر عمل شود:

بیمار روی تخت معاینه طوری بخوابد که صورت او رو به پایین بوده و سر او پایین‌تر از سینه قرار گیرد. سپس پس از دم عمیق نفس خود را نگه‌داشته با یک بازدم محکم خلط را خارج کند. این عمل باید تا تهیه نمونه کافی از خلط ادامه یابد.

➢ **نگه‌داری:** باید نمونه هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در غیر این‌صورت در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگه-داری شود.

●● همه نمونه‌های تنفسی به جز خلط، باید در محیط کشت انتقالی مناسب باکتری‌ها/ ویروس‌ها منتقل گردند.

●●نمونه‌های باکتریایی تا مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و ویروس‌ها در محیط انتقالی مناسب در دمای ۸-۴°C قابل انتقال می‌باشند.

جمع‌آوری نمونه چشم

سواپ‌ها و گسترش‌های قرنیه و ملتحمه نمونه‌های معمول جهت تشخیص کونژکتیویت حاد ناشی از عوامل باکتریایی و ویروسی می‌باشند. تمام نمونه‌های گرفته شده از ترشحات قرنیه و ملتحمه باید از نظر این‌که از چشم چپ یا راست تهیه شده، برچسب‌گذاری گردند. جهت جمع‌آوری این نمونه‌ها باید شرایط استریل رعایت گردد. قبل از نمونه‌برداری بیمار نباید دارو یا قطره‌ای استفاده کرده باشد. قابل ذکر است که نمونه‌برداری از تراشه‌های قرنیه باید توسط پزشک متخصص چشم صورت گیرد.

روش جمع‌آوری سواپ‌های ملتحمه

مراحل جمع‌آوری سواب‌های ملتحمه به شرح زیر است:

۱- پوست اطراف چشم را با یک ماده ضد عفونی‌کننده ملایم تمیز کنید.

۲- سواپ استریل آلژینات کلسیم یا نخی را در سرم استریل مرطوب کرده و به‌طور دورانی بر روی ملتحمه بمالید.

۳- سواپ را در لوله در پیچ‌دار حاوی محیط انتقالی مناسب قرار دهید.

۴- بر روی لوله مذکور علاوه بر نام بیمار، نوع نمونه و زمان جمع‌آوری نمونه نیز ذکر گردد.

۵- از سواپ ملتحمه نیز دو گسترش بر روی یک لام تهیه می‌گردد. این کار بهتر است در محل نمونه‌برداری صورت گیرد. جهت شناسایی کلامیدیا مهم است که گسترش‌ها در محل نمونه‌برداری و قبل از انتقال تهیه شود. گسترش‌ها برچسب‌گذاری شده و نباید در دمای یخچال نگه‌داری شده یا منجمد گردند.

- **نقل و انتقال نمونه**

نمونه جهت شناسایی باکتری‌های پاتوژن در دمای محیط، در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

نمونه جهت شناسایی ویروس‌های پاتوژن در دمای ۸-۲°C در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می‌شوند.

گسترش‌های تهیه شده در هوا خشک شده و در دمای محیط در جعبه لام منتقل می‌شوند.

تهیه نمونه جهت کشت خون

ضروری است دقت بیشتری جهت ضد عفونی‌کردن محل نمونه‌گیری صورت گیرد. ابتدا موضع با الکل ۷۰٪ تمیز شده سپس با محلول povidne–iodine ۱٪-۱۰ (یا کلرهگزیدین گلوکونات) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن موضع مجددا جهت حذف ید و کلرهگزیدین با الکل تمیز می‌گردد. کلرهگزیدین گلوکونات جهت نوزادان دو ماهه و بزرگ‌تر و هم‌چنین بزرگسالان دارای حساسیت نسبت به ید پیشنهاد می‌گردد. به‌دنبال خون‌گیری باید خون در عرض ۱ دقیقه به محیط کشت تلقیح شود. درب شیشه‌های کشت خون نیز باید قبل از تلقیح با الکل ۷۰٪ و سپس با محلول povidne–iodine ۱٪-۱۰ (بتادین) ضدعفونی گردد.

محیط کشت تلقیح شده را چندین بار تکان داده، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در انکوباتور ۳۵°C قرار داده شود.

- **حجم خون مورد نیاز**

•• کودکان: حجم ۳-۱ میلی‌لیتر ختون کافی می‌باشد. این مقدار خون در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

•• بزرگسالان: حجم خون جمع‌آوری شده به میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر است که در ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت خون رقیق می‌گردد.

- **روش خنثی‌سازی عوامل ضد میکروبی در خون**

با اضافه نمودن مهار کننده‌های شیمیایی نظیر سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) ۰٪/۰۵-۰٪/۰۲۵ به محیط کشت و رقیق-سازی خون، ویژگی‌های باکتریسیدال خون و آنتی بیوتیک‌های احتمالی خنثی می‌گردد. قابل ذکر است که سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) فعالیت‌های ضد فاگوسیتی، ضد کمپلمانی، ضد انعقادی و ضد لیزوزمی دارد و اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده شود، اثر مهارکنندگی در رشد میکروب‌ها خواهد داشت.

- **کشت مجدد**

شیشه‌های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت (صرف نظر از وجود علایم رشد) کشت مجدد داده و سپس تا هفت روز هر روز بررسی کنید. هر نوع کدورت یا لیز گلبول‌های قرمز ممکن است نشانگر رشد میکروبی باشد و به‌طور حتم باید بلافاصله کشت مجدد انجام شود.

قابل ذکر است که ممکن است علی‌رغم عدم وجود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته باشد، لذا ضروری است در فواصل۲۴-۶ ساعت اولیه بعد از تلقیح، راس ۴۸ ساعت و نیز در روز هفتم نیز کشت مجدد صورت گیرد.

•• قبل از انجام کشت مجدد شیشه کشت خون باید چند بار تکان داده شود.

•• جهت برداشت خون از محیط کشت، درپوش محیط کشت را با الکل و بتادین ضد عفونی کرده و حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه را به محیط آگار انتخاب شده منتقل کنید.

نمونه‌برداری از مجاری ادراری تناسلی مردان

با دو سواپ استریل از ترشحات چرکی نمونه‌برداری کنید. یکی از سواپ‌ها جهت تهیه گسترش و دیگری جهت کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی‌که ترشحی مشهود نباشد با سواپ نازک به اندازه ۳-۲ سانتی‌متر درون مجرا وارد شده و قبل از بیرون آوردن در مجرا چرخانده شود.

در صورتی‌که آزمایش با تاخیر انجام گیرد، سواپ باید در محیط انتقالی نگه‌داری شود.

نمونه‌برداری از دهانه رحم- ترشحات واژن

جهت نمونه‌گیری ابتدا سرویکس با کمک اسپیکولوم که با آب گرم مرطوب شده مشاهده می‌شود (بدون استفاده از مواد Lubricant). قبل از نمونه‌گیری باید تمامی ترشحات از دهانه خارجی رحم پاک شود. با یک سواپ استریل تا حدود ۳-۲ سانتی‌متر درون دهانه رحم وارد شده و چند ثانیه در محل چرخانده شود تا ترشحات جذب سواپ گردد سپس بدون تماس با سطح واژن سواپ باید خارج شده و در لوله درپوش‌دار استریل قرار گیرد. سواپ باید فورا در محیط کشت مناسب کشت داده شود و یا به کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه ارسال گردد. جهت تهیه گسترش مستقیم با سواپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه‌گیری صورت می‌گیرد.

ترشحات واژن با استفاده از اسپیکولوم (بدون استفاده از مواد Lubricant) و سواپ استریل از فورنیکس خلفی گرفته می‌شود. نمونه با سه سوآپ گرفته می‌شود، یکی را جهت تهیه گسترش مرطوب در لوله درپوش‌دار محتوی سرم فیزیولوژی استریل قرار داده و دو تای دیگر جهت کشت و تهیه گسترش مستقیم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در صورت مشکوک بودن به نایسریا نمونه پس از تهیه سریعا در دمای اتاق به آزمایشگاه ارسال می‌شود.

سواپ‌های آلژینات کلسیم و بعضی سواپ‌های پنبه‌ای مهار کننده نایسریا بوده، لذا بهتر است از سواپ داکرون یا ریون استفاده شود.

جمع‌آوری نمونه جهت ضایعات پوستی

در اکثر ضایعات پوستی تشخیص ممکن است بر اساس مشاهده ظاهری و تاریخچه‌ی بیماری بدون جمع‌آوری نمونه‌های تشخیصی صورت گیرد. در مشاهده ظاهری ضایعه، نکات مهمی از قبیل نوع ضایعه پوستی (اریتماتوس، ماکولار، پاپولار، ماکولوپاپولار، وزیکولار، بولوس، پتشیال، پورپوریک و غیره) و نحوه پراکندگی آناتومیک ضایعه (مرکزی، محیطی منتشر و

غیره) باید در نظر گرفته شود. در مواردی با تشخیص نامعلوم، غیرمعمول و نادر ممکن جمع‌آوری نمونه از راش‌ها یا ضایعات پوستی نیاز باشد. در موارد راش‌های وزیکولار، نمونه‌ها جهت بررسی میکروسکوپی و کشت نمونه مستقیما از وزیکول‌ها تهیه می‌گردد. در خصوص سایر ضایعات اگزانتوماتو (ماکولار یا پاپولار) ممکن است تشخیص بیشتر بر پایه سایر روش‌ها، نظیر کشت خون و سرولوژی صورت گیرد.
در موارد مشکوک به آنتراکس پوستی یا ضایعات خیارکی ممکن است نمونه‌ها از زخم‌های پوستی و هم‌چنین نمونه برای کشت خون تهیه شود.

● روش جمع‌آوری

⁕ راش‌های وزیکولو - پوستولار (جهت تشخیص عفونت‌های ویروسی)

زخم یا وزیکول تازه و رسیده را با اتانول ۷۰٪ تمیز نمایید.
وزیکول: سرنگ توبرکولین با سوزن ۲۷-۲۶ را در حالی که سر سوزن آن به سمت بالا قرار دارد، در پایه وزیکول وارد کنید. مایع را آسپیره نموده و سریعا و با دقت به داخل ظرف حاوی ۲-۱ میلی‌لیتر محیط انتقال ویروسی تخلیه نمایید (یک‌بار سرنگ را با محیط انتقالی شست‌وشو دهید).
زخم: پوسته زخم را بالا آورده و به کمک سواپ استریل داکرونی بر روی پایه زخم بمالید (سواپ آلژینات کلسیم نباید استفاده شود). سپس سوآپ به سرعت در ظرف حاوی محیط انتقال قرار گیرد.
تهیه گسترش: پایه زخم به کمک اسکالپل یا کورت تراشیده شده و سوسپانسیونی از ضایعات در دو تا سه قطره از محیط انتقالی تهیه نمایید. از سوسپانسیون فوق دو تا سه قطره بر روی لام بگذارید. پس از خشک شدن در هوا در استون سرد فیکس نمایید.

⁕ نمونه کبره

•• به وسیله لانست و فورسپس یک‌بار مصرف، کبره‌ها را از محل خودش جدا نمایید.
•• ۵-۱۰ لایه کبره را برداشته و در ظرف پلاستیکی در پیچ‌دار قرار دهید.
•• اگر مشکوک به آنتراکس جلدی هستید، مایع وزیکولی زیر محل زخم نمونه تشخیصی بهتری نسبت به تکه‌های زخم می‌باشد.

⁕ آسپیراسیون آبسه‌ها

•• آسپیراسیون آبسه فقط باید توسط پزشک صورت گیرد.
•• پوست روی آبسه / خیارک بوسیله ایزو پروپیل الکل ۷۰٪ ضد عفونی شده و مایع به وسیله آسپیراسیون توسط سرنگ استریل جمع آوری می گردد.
•• نمونه را به‌طریق آسپتیک به لوله استریل حاوی محیط انتقالی منتقل کنید.

● انتقال نمونه

نمونه‌ها جهت بررسی باکتریولوژیک باید در محیط آستوارت یا آمیس و سواپ‌های مشکوک به عوامل ویروسی در محیط انتقالی ویروس منتقل گردد.
در صورتی که نتوان نمونه‌ها را تا مدت ۲ ساعت بررسی نمود، نمونه‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قابل نگه‌داری هستند. نمونه‌ها جهت جداسازی عوامل ویروسی در محیط انتقالی مناسب در دمای ۴°C-۸ قابل نگه‌داری بوده و در اسرع وقت باید به آزمایشگاه منتقل گردد.

نگه‌دارنده‌ها، ضد انعقادها و مواد افزودنی

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

● ضد انعقادهای رایج جهت نمونه خون

ضد انعقادهای رایج مورد استفاده جهت نمونه خون شامل موارد زیر می‌باشند:

•• اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سیترات سدیم، هپارین، سدیم پلی سولفانات (SPS)، فلوراید سدیم و اسید سیترات دکستروز (ACD) می‌باشد.

اتیلـن دی آمیـن تتـرا استیک اسید (EDTA) که به اشکال نمک‌های سدیم و پتاسیم و لیتیم موجود است. مورد استفاده آن در بخش‌های خون‌شناسی، بیوشیمی و بانک خون می‌باشد. جهت شمارش سلول‌های خونی و تشخیص افتراقی نمک پتاسیک آن توصیه می‌گردد.

•• سیترات سدیم جهت آزمون‌های انعقادی و سرعت رسوب گلبولی کاربرد دارد.

•• هپارین به فرم نمک‌های لیتیم و سدیم در اندازه‌گیری بسیاری از پارامترهای خون و بررسی‌های ایمونولوژیک به همراه آزمون مقاومت گلبولی کاربرد دارد.

•• فلوراید سدیم جهت اندازه‌گیری گلوکز کاربرد دارد.

•• سدیم پلی سولفانات به‌عنوان ضد انعقاد جهت شیشه‌های کشت خون استفاده می‌گردد.

•• اسید سیترات دکستروز به‌عنوان ماده ضد انعقاد در کیسه‌های 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 اسید بوریک مناسب می‌باشد. با استفاده از نگه‌دارنده نمونه ادرار تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق جهت بررسی باکتریولوژیک قابل نگه‌داری است.

•• نمونه مدفوع جهت کشت عوامل باکتریایی را در صورتی که نتوان سریعا به آزمایشگاه ارسال نمود تا ۲ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است، در غیر این‌صورت نمونه‌ها را می‌توان در محیط‌های نگه‌دارنده و انتقالی نظیر استوارت، آمیس و کری‌بلر منتقل نمود. در بعضی مواقع می‌توان با اضافه نمودن زغال به محیط استوارت و آمیس اسیدهای چرب موجود در سواپ‌های پنبه‌ای، که بازدارنده ارگانیسم‌های سخت رشد نظیر نایسریا گونوره و بوردتلا پرتوسیس می‌باشند را جذب نمود.

•• مدفوع از نظر توکسین کلستردیوم دیفیسیل باید بدون مواد نگه‌دارنده جمع‌آوری گردد و این نمونه تا ۴۸ ساعت در دمای ۴°C قابل نگه‌داری است. در صورت تاخیر بیشتر، نمونه باید در دمای ۷۰°C- نگه‌داری گردد.

•• نگه‌دارنده مناسب جهت تخم انگل، تروفوزیت وکیست تک یاخته فرمالین ۱۰٪، پولی وینیل الکل و سدیم استات فرمالین (Sodium Acetate Formalin = SAF) است.

● مواد ضد انعقاد در بررسی‌های میکروبیولوژی

جهت جلوگیری از ایجاد لخته در نمونه‌های خون، مغز استخوان و مایع سینوویال از مواد ضد انعقاد استفاده می‌شود. باند شدن میکروارگانیسم‌ها به لخته، شناسایی آن‌ها را مشکل می‌سازد، لذا استفاده از ضد انعقاد ضروری است. انتخاب نوع و غلظت ضد انعقاد به‌دلیل اثر ضد میکروبی بعضی از آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) معمول‌ترین ضد انعقاد مورد استفاده جهت نمونه‌های میکروبی می‌باشد. غلظت مورد استفاده نباید بیشتر از ۰/۰۲۵ (وزنی/ حجمی) باشد. گونه‌های نایسریا و بعضی باکتری‌های بی‌هوازی به غلظت‌های بالای سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) حساس هستند. نسبت نمونه به ضد انعقاد سدیم پلی آنتول سولفات بسیار مهم است، لذا لازم است حجم‌های متفاوت از ضد انعقاد در لوله با سایز بزرگ (جهت نمونه بزرگسال) و کوچک (جهت نمونه اطفال) و هم‌چنین جهت مقادیر کم ارگانیسم در نمونه‌های مغز استخوان و مایع سینوویال موجود باشد.

•• هپارین دیگر ماده ضد انعقاد متداول می‌باشد و اغلب جهت کشت ویروسی و جداسازی گونه مایکوباکتریوم از خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته هپارین مهارکننده رشد باکتری‌های گرم مثبت و قارچ هاست.

سیترات سدیم و EDTA جهت نمونه‌های میکروبیولوژیک نباید مورد استفاده قرار گیرد.

نگه‌داری نمونه

در صورتی‌که نتوان نمونه‌ها را در اسرع وقت پس از دریافت نمونه مورد بررسی قرار داد، باید آن‌ها را در شرایط مناسب نگه-داری کرد. دماهای متفاوت مورد استفاده، دمای اتاق (۲۲°C)، دمای یخچال (۴°C)، دمای بدن (۳۷°C) و دمای فریزر (۲۰°C -۷۰°C-) می‌باشند که بسته به نوع محیط انتقالی (درصورت استفاده) و عامل اتیولوژیک عفونت متفاوت است.

بعضی نمونه‌ها نظیر ادرار، مدفوع، نمونه جهت بررسی عوامل ویروسی، خلط، سواپ‌ها (به‌غیر از عوامل بی‌هوازی)، وسایل خارجی نظیر کاتتر را می‌توان در دمای ۴°C نگه‌داری نمود.

•• پاتوژن‌هایی که به سرما حساسند باید در دمای اتاق نگه‌داری شوند. این عوامل ممکن است در نمونه‌هایی که حاوی باکتری‌های بی‌هوازی بوده و هم‌چنین در اکثر مایعات استریل بدن، نمونه‌های ژنیتال، سواپ گوش و چشم نیز موجود باشند.

•• سرم جهت بررسی‌های سرولوژیک تا یک هفته در دمای ۲۰°C– قابل نگه‌داری است.

•• نگه‌داری طولانی مدت بافت‌ها یا نمونه‌ها در دمای ۷۰°C- صورت می‌گیرد.

•• مایع مغزی نخاعی در صورتی‌که سریعا مورد بررسی قرار نگیرد تا ۶ ساعت در دمای ۳۵°C قابل نگه‌داری است. جدول ۴-۳ شرایط نگه‌داری نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۳: شرایط نگه‌داری نمونه

دمای ۴°C	دمای اتاق (۲۲°C-۲۶)
نوک کاتتر (IV)	آبسه- زخم- ضایعه
مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی ویروس	مایعات بدن
گوش خارجی	مایع مغزی نخاعی جهت شناسایی باکتری
مدفوع (بدون نگه‌دارنده)	گوش داخلی
مدفوع جهت توکسین کلستردیوم دیفیسیل تا ۳ روز (بیشتر از ۳ روز نگه‌داری در ۷۰°C-)	مدفوع (با ماده نگه‌دارنده)
خلط	تناسلی
ادرار (بدون نگه‌دارنده)	بینی- نازوفارنکس – گلو
	بافت
	ادرار (با ماده نگه‌دارنده)

موارد رد نمونه

موارد رد نمونه به شرح زیر بیان می‌گردد:

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

•• استفاده از محیط انتقالی نامناسب

•• جمع‌آوری نمونه در ظرفی که دارای نشت است

•• نمونه ناکافی

•• زمان انتقال بیش از ۲ ساعت در نمونه‌های بدون مواد نگه‌دارنده

•• انتقال نمونه در دمای نامناسب

•• خشک شدن نمونه

•• دریافت نمونه در محلول فیکساتیو نظیر فرمالین (نمونه مدفوع مستثنی می‌باشد)

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

•• نمونه حاصل از کاتتر فولی

•• بیش از یک نمونه با یک منشا از یک مریض در همان روز (به‌غیر از موارد کشت خون)
•• نمونه سواپ با درخواست‌های متعدد برای ارگانیسم‌های مختلف
•• نمونه خلط که در رنگ‌آمیزی گرم کمتر از ۲۵ سلول سفید و بیش از ۱۰ سلول اپی‌تلیال در بزرگ نمایی پایین داشته باشد.

در جدول ۵-۳ تحت عنوان مدیریت نمونه و راهنمای برخورد با آن به‌طور خلاصه مباحث این فصل بیان گردیده است.