



دستورالعمل مدیریت نمونه در

آزمایشگاه های پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تابستان ۱۳۹۶

محل مهر تضمین کیفیت	
تاریخ :	تاریخ :

صفحه 1 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

مقدمه

نتایج آزمایش‌ها تحت تاثیر متغیرهای گوناگونی است که شناسایی آن‌ها و به دنبال 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 تأکید بر اجرای روش‌های کنترل کیفی در کلیه بخش‌های آزمایشگاه در مرحله حین آزمایش و به دنبال آن برگزاری دوره‌های آموزشی در این خصوص، خطاهای حین آزمایش به حداقل رسیده است و لذا تأثیر متغیرهای قبل و بعد از آزمایش بسیار پررنگ شده است. با توجه به اهمیت متغیرهای قبل از آزمایش در اینجا 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 و 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 تأثیر قرار دهد، کمک شایانی خواهد نمود.

کیفیت نتایج آزمایش‌هایی که در آزمایشگاه انجام می‌شود، هم ارزش نمونه‌هایی است که مورد آزمایش قرار می‌گیرند.

مدیریت نمونه‌های آزمایشگاهی به‌عنوان بخشی از فرآیند قبل و پس از انجام آزمایش تأثیر به‌سزایی در تشخیص، پیگیری و درمان بیماران داشته و در حوزه‌های زیر قابل بحث می‌باشد:

- نقش کلیدی در صحت تشخیص آزمایشگاهی
- تأثیر در روند مراقبت از بیمار
- تأثیر در تصمیم‌گیری بالینی پزشک
- تأثیر در مدت زمان بستری شدن بیمار در بیمارستان و به دنبال آن، هزینه‌های بستری و آزمایشگاه
- تأثیر بر کارایی آزمایشگاه

اثرات ناشی از نمونه‌های نامناسب و عدم صحت نتایج آزمایش بر روی این نمونه‌ها:

- تاخیر در گزارش نتایج آزمایش‌ها
- نمونه‌گیری‌های غیر ضروری
- کاهش رضایت مندی مراجعین
- افزایش هزینه بیمار، آزمایشگاه و بیمارستان
- تشخیص‌ها و درمان غلط، طولانی شدن مدت بستری
- آسیب و احتمال مرگ

مدیریت نمونه‌های آزمایشگاهی در فرآیند قبل از انجام آزمایش:

درخواست آزمایش، شناسایی بیمار، نحوه جمع‌آوری انواع نمونه‌های کلینیکی، آماده‌سازی نمونه، جابه‌جایی و نقل انتقال نمونه، معیارهای رد نمونه، شرایط نگهداری و ارجاع نمونه

در فرآیند بعد از انجام آزمایش، نگهداری نمونه پس از انجام آزمایش و امحاء نمونه را شامل می‌شود. هر یک از این مراحل فوق‌الذکر نیاز به مدیریت داشته، سیاست آزمایشگاه باید در این خصوص تعریف گردد.

صفحه 2 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

♦ فرآیند قبل از آزمایش

• درخواست آزمایش / شناسایی بیمار

درخواست آزمایش باید از نظر قابلیت پذیرش و انجام بررسی شود. هر آزمایشگاه باید فهرست آزمایش های قابل انجام خود را تهیه و در اختیار مسئول پذیرش قرار دهد. همچنین باید از هویت بیمار قبل از پذیرش، اطمینان حاصل گردد و انطباق مشخصات برگه درخواست آزمایش با مشخصات بیمار صورت گیرد.

• نحوه جمع آوری انواع نمونه های کلینیکی

هر آزمایشگاه با توجه به دامنه فعالیت خود باید دستورالعمل نحوه جمع آوری نمونه های کلینیکی را تهیه و در اختیار کارکنان آزمایشگاه قرار دهد. این دستورالعمل شامل موارد زیر می باشد:

- نحوه اطمینان از هویت بیمار
- شرایط مربوط به آماده سازی بیمار قبل از نمونه گیری
- نمونه مورد نیاز در خصوص انواع آزمایش ها
- ظروف جمع آوری نمونه، نوع ضد انعقاد، حجم نمونه
- مشخصات برچسب نمونه، همچنین برچسب گذاری باید به نحوی باشد که امکان ردیابی نمونه به سهولت امکان پذیر باشد.

•• شرایط نگهداری نمونه قبل از انجام آزمایش

◀ ردیابی نمونه

اطلاعات زیر جهت ردیابی کامل نمونه در آزمایشگاه مورد نیاز است که به صورت دستی یا نرم افزاری باید ثبت شود:

- شماره آزمایش
- نام و نام خانوادگی بیمار
- زمان نمونه گیری: روز – ساعت – دقیقه
- نوع نمونه
- آزمایش های انجام شده
- نام پزشک
- بخش موقعیت بیمار: بخش – کلینیک
- نتایج آزمایش ها
- تاریخ و ساعت جواب آزمایش

◀ ذخیره سازی نمونه

تدوین سیاست آزمایشگاه در مورد ذخیره سازی نمونه شامل موارد زیر است:

- تعیین نمونه هایی که باید نگه داری شوند.
- مدت زمان نگه داری
- محل نگه داری
- شرایط مناسبی که نمونه باید در آن نگه داری شود (درجه حرارت مناسب)
- کنترل مرتب نمونه ها از نظر تعداد موارد یخ زدن / آب کردن (Freeze/thaw) نمونه
- چیدمان منظم نمونه ها در محل مورد نگه داری (یخچال) مثلاً بر اساس شماره پذیرش یا روز پذیرش نمونه ها
- برنامه زمان بندی جهت کنترل دوره ای نمونه ها
- برقرار نمودن روشی جهت ردیابی نمونه

صفحه 3 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

➤ نحوه نقل و انتقال و جابه جایی نمونه

انتقال نمونه های بیولوژیک نظیر خون، ادرار و سایر مایعات بدن از محل نمونه گیری به آزمایشگاه جزء مهمی از چرخه کاری در آزمایشگاه می باشد.

در آزمایشگاه باید شرایط انتقال نمونه از نظر درجه حرارت، ظروف مورد استفاده، حداکثر زمان مجاز جهت انتقال نمونه، نحوه انتقال نمونه با درخواست اورژانس و ملاحظات ایمنی تعریف، مکتوب و کارکنان مرتبط از آن اطلاع داشته باشند.

بسته بندی کلیه نمونه ها باید به روش استاندارد و با استفاده از سه محفظه صورت گیرد. با توجه به نوع نمونه ای که منتقل می شود، اطلاعات روی برچسب الصاق شده روی محفظه خارجی نمونه متفاوت است.

➤ رد نمونه

دستورالعمل معیارهای رد و قبول انواع نمونه های کلینیکی و نحوه برخورد با آن باید تدوین شده و به کارکنان مرتبط در این خصوص آموزش های لازم داده شود. گاهی موارد "رد نمونه" مشکل است، اما باید به خاطر داشت که نمونه فاقد شرایط استاندارد از نظر کیفیت و کمیت نتایج صحیح نمی دهد.

➤ ارجاع نمونه

در روند ارجاع یکی از مهم ترین فرآیندهایی که باید مدنظر گرفته شود، مدیریت نمونه است که شامل کلیه اقداماتی است که جهت حفظ تمامیت و کیفیت نمونه از زمان جمع آوری و طی مراحل نگهداری و انتقال نمونه صورت گیرد. مدیریت فرآیند پس از انجام آزمایش، نحوه گزارش دهی و ارسال نتایج و نگهداری سوابق مربوطه در آزمایشگاه ارجاع و ارجاع دهنده نیز باید طبق ضوابط مشخصی صورت گیرد.

➤ امحاء نمونه

هر آزمایشگاه باید نحوه دفع مواد زائد را مستند نموده و بر اساس آن عمل نماید. در این مستند باید به قوانین امحاء مواد زائد در کشور توجه شود. نحوه بی خطر سازی پسماند مشخص شود، فرد مسئول نظارت بر این روند مشخص شود. اصول ایمنی رعایت شود.

◆ مدیریت نمونه در زمان انجام آزمایش

مدیریت نمونه در زمان انجام آزمایش در ادامه این فصل مورد بحث قرار می گیرد.

◆ نگهداری نمونه پس از انجام آزمایش

آزمایشگاه باید سیاست خود را در خصوص نگهداری انواع نمونه های کلینیکی با در نظر گرفتن ملاحظات زیر به صورت دستورالعمل مکتوب تعریف نماید:

مکان و دمای نگهداری نمونه های کلینیکی، حداکثر زمان نگهداری، نحوه بی خطر سازی و امحاء نمونه ها

تجهیزات لازم جهت اتاق نمونه برداری

نمونه گیری 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 محلول های تمیزکننده دست موجود باشد.

۱- صندلی نمونه برداری: باید دارای دسته قابل تنظیم باشد به طوری که بیمار بتواند در راحت ترین وضعیت جهت نمونه گیری روی صندلی بنشیند. همچنین صندلی باید دارای حفاظ ایمنی جهت جلوگیری از افتادن بیمار باشد.

۲- تخت معاینه

۳- سینی جمع آوری ظرف های نمونه

۴- دستکش

• دستکش در صورت آلودگی و یا در فواصل نمونه گیری ها باید تعویض گردد.

صفحه 4 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

- ۵- سوزن (19-23G)
- ۶- سرنگ یا نگه دارنده مخصوص (holder) جهت استفاده از لوله های خلاء (evacuated tube)
- ۷- نیشتر یک بار مصرف
- ۸- انواع لوله ها و ظروف در پیچ دار یا لوله های خلاء
- ۹- بازوبند (tourniquet)
- ۱۰- یخچال یا یخ باید در دسترس باشد
- ۱۱- ضد عفونی کننده ها:
- ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪
- محلول povidone – iodine ۱۰-۱٪ یا کلر هگزیدین گلوکونات جهت کشت خون
- ۱۲- گاز پارچه ای در ابعاد ۵×۵ cm یا ۷/۵×۷/۵ cm (استفاده از پنبه پیشنهاد نمی گردد). باند و گاز باید جهت پانسمان در دسترس باشد.
- ۱۳- ظروف مخصوص دفع سرسوزن های آلوده (Puncture Resistant Disposal Container)
- ۱۵- فهرست انواع آزمایش ها و درج مقدار خون لازم برای هر آزمایش و نوع لوله مورد استفاده
- ۱۶- روتاتور جهت مخلوط نمودن لوله های محتوی خون

نمونه گیری وریدی

مراحل نمونه گیری

- خون گیری صحیح نیاز به دانش و مهارت توأم دارد. جهت جمع آوری نمونه خون وریدی، خون گیر کار آزموده باید مراحل زیر را پی گیری نماید:
- ۱- انطباق مشخصات برگه درخواست آزمایش با مشخصات بیمار
 - ۲- اطمینان از رعایت رژیم غذایی پیش از نمونه گیری
 - ۳- انتخاب وسایل مورد نیاز
 - سرنگ و سرسوزن مناسب یا لوله خلاء براساس نوع آزمایش انتخاب می شود.
 - * به طور کلی توصیه می گردد به دلیل رعایت اصول ایمنی از سرنگ و سرسوزن استفاده نشود و لوله های خلاء جایگزین آن گردند.
 - ۴- استفاده از دستکش
 - ۵- وضعیت بیمار هنگام نمونه گیری
 - بیمار بر روی صندلی نمونه گیری نشسته و دست خود را به منظور برجسته شدن وریدها مشت کرده و به نحوی روی دسته صندلی نمونه برداری قرار می دهد 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 می شود.
 - ۶- بستن تورنیکه
 - به منظور افزایش پر شدن ورید از خون و برجسته شدن رگ مورد نظر و جهت تسهیل ورود خون به داخل سرنگ یا لوله های خلاء از رگ بند (تورنیکه) استفاده می شود (قابل ذکر است در مواردی نظیر اندازه گیری لاکتات خون نباید تورنیکه بسته شود).
 - رگ بند باید ۱۰-۷/۵ سانتی متر بالای ناحیه نمونه گیری بسته شود و نباید بیش از یک دقیقه بر روی بازوی بیمار بسته بماند.
 - ۷- انتخاب ورید مناسب
 - در اغلب موارد نمونه گیری از وریدهای Median cubital و Cephalic صورت می گیرد. خون گیری از وریدهای پشت دست نیز قابل قبول است، ولی وریدهای سطح داخلی مچ نباید مورد استفاده قرار گیرند.

صفحه 5 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

۸- تمیز کردن محل نمونه گیری

ناحیه نمونه گیری به کمک گاز آغشته به ایزوپروپیل الکل یا اتیل الکل ۷۰٪ به صورت حرکت دورانی از داخل به خارج تمیز می شود. نمونه گیری پس از خشک شدن موضع در هوا، به منظور جلوگیری از همولیز و کاهش سوزش ناشی از تماس نوک سوزن با الکل و پوست، صورت می گیرد.

۹- نمونه گیری

باید سر سوزن در حالی که قسمت مورب نوک آن به سمت بالا است، با زاویه 30°C یا کمتر وارد ورید شود.

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

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

•• حتی الامکان سوزن در رگ ثابت نگه داشته شده و اولین لوله با فشار به سوزن مرتبط شود.

•• لوله ها باید تا خاتمه مکش از خون پر شوند. پس از وقفه جریان خون اولین لوله از سوزن جدا شده و لوله های بعدی به سوزن متصل می شوند.

•• لوله های حاوی ماده ضد انعقاد و خون باید بلافاصله پس از پرشدن مخلوط شوند (با ۱۰-۵ مرتبه سروته نمودن). جهت جلوگیری از همولیز نباید لوله ها به شدت مخلوط گردند.

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

۱۰- دفع سر سوزن

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

۱۱- تخلیه خون

نمونه هایی که در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد ریخته می شوند باید بلافاصله و به آرامی ۵ تا ۱۰ بار مخلوط شوند. در صورتی که نمونه در لوله بدون ماده ضد انعقاد ریخته می شود باید به آرامی در جدار داخلی لوله تخلیه گردد.

۱۲- اقدامات پس از نمونه گیری

پس از خاتمه نمونه گیری، باید موضع از نظر بند آمدن خون ریزی و یا به وجود آمدن هماتوم کنترل گردد.

۱۳- برچسب گذاری ظرف حاوی نمونه

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

- نام، نام خانوادگی بیمار، شماره شناسایی، تاریخ، زمان نمونه گیری (بخصوص در آزمایش های ردیابی دوز درمانی داروها TDM)، نام فرد خون گیر

خون گیری مویرگی - نمونه گیری از طریق سوراخ کردن پوست

(Skin Puncture)

خون گیری مویرگی در نوزادان، اطفال 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 ویژه ای برخوردار است.

• نواحی مناسب جهت سوراخ کردن پوست و جمع آوری نمونه:

- بند انتهایی انگشتان دست

- سطح داخلی و خارجی پاشنه پا

➤ در نوزادان کمتر از یک سال معمولاً خون گیری از پاشنه پا انجام می گیرد.

صفحه 6 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

➤ در اطفال و بزرگسالان معمولاً از سطح داخلی بند آخر انگشتان (انگشت سوم یا چهارم) 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 قبلاً جهت نمونه‌گیری سوراخ شده‌اند (به دلیل 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، خون‌گیری به وسیله لانتست استریل انجام می‌شود. قابل ذکر است که باید اولین قطره خون را به وسیله گاز پاک کرده و از قطرات بعدی استفاده نمود.

آماده‌سازی نمونه خون

سرم یا پلاسما باید در کوتاه‌ترین زمان به دنبال 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 به جز 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 ($22-25^{\circ}\text{C}$) 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 ($2-8^{\circ}\text{C}$) 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 فعال‌کننده 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 ۳۰-۱۵ دقیقه می‌رسانند. (استفاده از اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی جهت جداسازی لخته از دیواره لوله پیشنهاد نمی‌گردد)

صفحه 7 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

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

•• سرد نمودن: بعضی نمونه ها باید تا قبل از عمل سانتریفیوژ و جداسازی در سرما نگهداری شوند. سرد کردن نمونه، متابولیسم سلول های خونی را مهار نموده و سبب پایداری اجزای حساس به حرارت می گردد. جهت سرد نمودن، نمونه باید سریعاً در یخ خرد شده یا مخلوطی از آب و یخ قرار گیرد (استفاده از تکه های بزرگ یخ به دلیل تماس ناکافی بین نمونه و یخ قابل قبول نمی باشد). یخ باید کاملاً اطراف سطح خون درون لوله را احاطه کند.

نکته: قرار دادن نمونه خون بیش از دو ساعت در سرما سبب افزایش کاذب پتاسیم می گردد. سرما سبب مهار گلیکولیز شده، لذا انرژی جهت پمپ پتاسیم به داخل سلول ایجاد نمی گردد و بدنبال آن پتاسیم از سلول ها به بیرون نشت می کند. نمونه جهت اندازه گیری الکترولیت ها نیز نباید تا قبل از سانتریفیوژ و انجام آزمایش در دمای ۸-۲°C قرار گیرد.

نمونه خون جهت اندازه گیری ترکیباتی نظیر کاتکول آمین ها، آمونیاک، اسید لاکتیک، پیروات، گاسترین، هورمون پاراتیروئید، فعالیت رنین پلاسما و اسید فسفاتاز، باید پس از جمع آوری در سرما نگهداری شود.

•• نگهدارنده ها و مهارکننده های متابولیک: بعضی افزودنی ها می توانند از تغییرات غلظت مواد در نمونه با گذشت زمان جلوگیری نمایند. مواد آنتی گلیکولیتیک نظیر فلوراید می توانند گلوکز را در حضور سلول های خونی به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۴-۲۲°C) و تا ۴۸ ساعت در دمای یخچال (۸-۲°C) پایدار نگهدارند. به دلیل حساسیت اندازه گیری گلوکز در نوزادان و اطفال می توان از مواد افزودنی آنتی گلیکولیتیک استفاده نمود. همچنین جهت اندازه گیری لاکتات باید از فلوراید سدیم یا اگزالات پتاسیم استفاده نمود.

انتقال

انتقال نمونه های بیولوژیک نظیر خون، ادرار و سایر مایعات بدن از محل نمونه گیری به آزمایشگاه جزء مهمی از چرخه کاری در آزمایشگاه می باشد. در مورد نمونه های خون روند انتقال ۱/۳ زمان چرخه کاری را شامل می شود.

* جمع آوری نمونه در محل آزمایشگاه

•• زمان: نمونه ها باید در ظروف در بسته مناسب در کوتاه ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال گردند. انتقال نمونه ها می بایست در شرایط دمای اتاق صورت گیرد، به جز نمونه هایی که باید با حفظ زنجیره سرد نگهداری و منتقل شوند. انتقال سریع نمونه از محل نمونه گیری به آزمایشگاه در شرایطی که دمای محل نمونه گیری بالاتر از ۲۲°C است از اهمیت زیادی برخوردار است.

•• وضعیت لوله: نمونه های خون باید در لوله های در پوش دار و در وضعیت قائم نگهداری گردند. این امر سبب تسریع فرایند انعقاد و همچنین کاهش به هم خوردگی محتوی لوله می گردد و احتمال ایجاد همولیز را نیز کاهش می دهد.

•• درپوش: نمونه ها باید در طول مدت انتقال و نگهداری در ظروف درپوش دار قرار گیرند. عدم وجود درپوش باعث خطا در نتایج بعضی متغیرها به دلیل از دست دادن دی اکسید کربن و افزایش PH نظیر کلسیم یونیزه و اسید فسفاتاز (افزایش می یابند) می گردد.

همچنین وجود درپوش خطر ایجاد آئروسول، تبخیر نمونه و آلودگی را نیز کاهش می دهد.

•• همولیز: حمل و نقل نمونه باید به آرامی صورت گیرد تا امکان آسیب به گلبول های قرمز را به حداقل رساند. وجود همولیز در نمونه سبب تداخل با عملکرد برخی دستگاه هایی می شود که به روش نوری پارامترها را اندازه گیری می -

صفحه 8 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

کنند. ترکیبات زیادی در سرم و پلاسما تحت تاثیر همولیز (با منشا خارجی) قرار می گیرند که نمونه هایی از آن به شرح زیر است:

- پارامترهایی که شدیداً تحت تاثیر همولیز قرار گرفته و افزایش می یابند شامل: هموگلوبین پلاسما، آسپارژین امینو ترانسفراز (AST)، پتاسیم، لاکتات دهیدروژناز می باشند.
 - پارامترهایی که به طور قابل توجهی تحت تاثیر همولیز قرار می گیرند شامل: آهن، آلانین امینو ترانسفراز (افزایش می یابند) و T4 (کاهش می یابد) هستند.
 - پارامترهایی که کمتر تحت تاثیر همولیز قرار گرفته ولی امکان افزایش آنها به دنبال همولیز وجود دارد شامل: فسفر، پروتئین توتال، آلبومین، منیزیم، کلسیم، و اسید فسفاتاز می باشند.
- قابل ذکر است پلاسمای حاوی ۲۰ میلی گرم در دسی لیتر هموگلوبین، به رنگ صورتی روشن و پلاسمای حاوی ۱۰۰ میلی گرم در دسی لیتر هموگلوبین، به رنگ قرمز است. بالا رفتن بیلی روبین در پلاسما ممکن است وجود هموگلوبین را بپوشاند به طور مثال غلظت ۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر هموگلوبین ممکن است با چشم غیر مسلح با وجود بیلی-روبین ۲۰ میلی گرم در دسی لیتر قابل رویت نباشد.
- وجود همولیز در نمونه خون کامل ممکن است با چشم قابل رویت نباشد لذا پیشنهاد می گردد در مواردی که نتایج متغیر مورد اندازه گیری بالاتر از محدوده مرجع آن می باشد، نمونه مورد آزمایش از نظر وجود همولیز نیز بررسی گردد. (با سانتیفریوژ 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 وایوله بسیار حساس هستند نظیر بیلی روبین، ویتامین A و B6 و بتا کاروتن بسیار اهمیت دارد. ظرف حاوی این نمونه ها جهت محافظت از نور باید در پوششی از کاغذ آلومینیوم پیچیده شده یا در ظرف شیشه ای قهوه ای نگه داری شوند.

* جمع آوری نمونه خارج از محل آزمایشگاه

در صورتی که در مرکزی فقط نمونه گیری انجام گیرد، نمونه های خون باید حداکثر تا دو ساعت پس از نمونه گیری 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 در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ نگه داری و با رعایت پایداری نمونه به آزمایشگاه ارسال کرد.

* دریافت نمونه

نمونه خون پس از دریافت و کامل شدن مرحله لخته، جهت سانتیفریوژ آماده می گردد. در صورتی که خون در لوله فعال کننده لخته جمع آوری شده باشد در طی مدت ۳۰-۵ دقیقه پس از نمونه گیری می تواند سانتیفریوژ گردد. نمونه در لوله حاوی ماده ضد انعقاد سریعاً قابل سانتیفریوژ می باشد.

جهت اندازه گیری بعضی متغیرها در خون نظیر سرب، سیکلوسپورین و هموگلوبین گلیکوزیله، خون کامل مورد استفاده قرار می گیرد. ولی اگر نمونه اشتباهاً سانتیفریوژ شود مشکلی ایجاد نشده و می توان آن را با همان شرایط به بخش مربوطه ارسال نمود.

نمونه هایی که باید در شرایط سرما نگه داری شوند ($2-8^{\circ}\text{C}$) تا آماده شدن جهت سانتیفریوژ باید در این درجه حرارت باقی بمانند. سانتیفریوژ یخچال دار در این خصوص پیشنهاد می گردد.

صفحه 9 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

* 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 آئروسول 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.

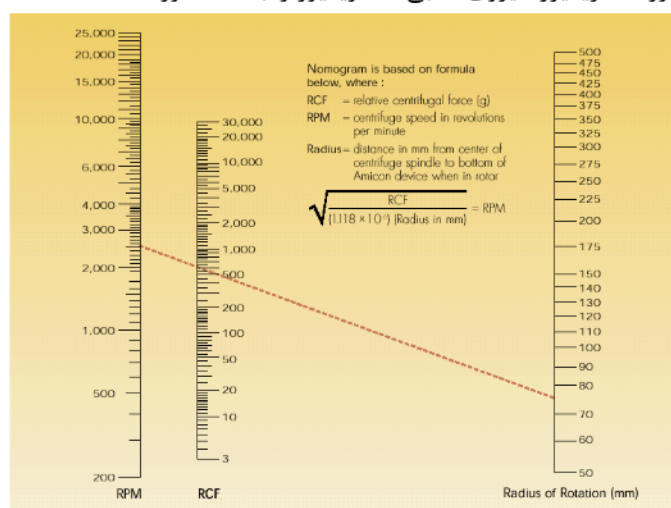
$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (RPM)^2$$

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 برای 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: نمودار تعیین نیروی نسبی سانتریفیوژ به کمک شعاع و میزان دور (RPM)

صفحه 10 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

برای مطالعه بیشتر به دستورالعمل فنی سانتریفیوژ مراجعه شود.

قابل ذکر است جهت برخی فاکتورها که به دما حساس هستند، باید از سانتریفیوژهایی که دمای آنها قابل کنترل است استفاده نمود. به طور مثال ترکیباتی نظیر ACTH و cAMP به گرما حساس هستند و انتقال و سانتریفیوژ آنها نیز باید در دمای 4°C صورت گیرد.

نکته: در صورتی که اندازه گیری پتاسیم هم به همراه ترکیباتی که حساس به دما هستند درخواست شده باشد باید توجه نمود که نمونه مذکور سریعاً از سانتریفیوژ خارج شود (دمای پایین تر از 15°C سبب افزایش کاذب پتاسیم پس از ۲ ساعت می گردد). لازم به ذکر است جهت اندازه گیری پتاسیم نمونه نباید بیش از یک بار سانتریفیوژ گردد.

* زمان مورد نیاز جهت سانتریفیوژ نمونه

- **تهیه سرم و پلاسما:** نمونه در ظرف درپوش دار باید به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در 1200g - 1000g سانتریفیوژ شود. در صورتی که آزمایش تا ۴ ساعت بعد از جداسازی سرم انجام نگیرد، سرم یا پلاسما باید در دمای $4-6^{\circ}\text{C}$ نگهداری گردد.
- **تهیه پلاسما جهت آزمون های انعقادی:** نمونه در ظرف درپوش دار باید به مدت ۱۵ دقیقه در 1500g 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 صورتی که سنجش مورد نظر تا ۸ ساعت صورت نگیرد نمونه باید در یخچال نگهداری گردد.
- در صورتی که امکان انجام آزمایش تا ۴۸ ساعت مقدور نباشد یا در صورت نیاز به نگهداری طولانی تر، سرم یا پلاسما باید در دمای 20°C - نگهداری شود.
- نکته: باید از آب شدن و یخ زدن مکرر نمونه های فریز شده جدا پرهیز گردد، زیرا این امر سبب از بین رفتن بعضی ترکیبات در سرم یا پلاسما می شود. استفاده از فریزرهای بدون برفک نیز جهت نگهداری نمونه پیشنهاد نمی گردد.
- در صورت استفاده از مواد آنتی گلیکولیتیک (نظیر فلوراید) گلوکز پلاسما تا ۲۴ ساعت در دمای 25°C و تا ۴۸ ساعت در دمای $8-2^{\circ}\text{C}$ پایدار می ماند. (حتی در صورت عدم جداسازی پلاسما از سلول ها) قابل ذکر است در صورتی که گلبول های قرمز، پلاکت و گلبول های سفید نمونه بالاتر از حد طبیعی باشند، اثر گلیکولیتیک این مواد کاهش می یابد. به دلیل مشکل بودن مهار گلیکولیز در نوزادان، باید پلاسما در اسرع وقت از سلول ها جدا گردد.
- در صورت استفاده از لوله های جمع آوری خلاء دارای ژل جداکننده همراه با افزودنی یا فعال کننده لخته، باید ملاحظات زیر صورت گیرد:
 - به محض جمع آوری خون جهت سرعت بخشیدن، تکمیل عمل لخته شدن و روند ضد انعقاد، لوله ها 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.
 - به طور کلی می توان سرم را در لوله های محتوی ژل تا ۴۸ ساعت در دمای 4°C نگهداری نمود، ولی باید قوام ژل به طور چشمی نیز بررسی گردد.

صفحه 11 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

تداخلات:

از لوله های جمع آوری خون حاوی ژل جداکننده جهت اندازه گیری میزان پروتسترون، داروهای سه حلقه ای ضداسپردگی، اندازه گیری سطح دارویی و آزمون های ایمنوهماتولوژی (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 می گیرد. 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 نمونه گیری مویرگی) ضد عفونی شده و با لانتست یکبار مصرف موضع سوراخ می گردد.
- ۲- یک یا دو قطره خون را با مرکز لام مماس می کنیم، باید توجه شود که لام با پوست تماس پیدا نکند.
- ۳- با گوشه یک لام دیگر یا اپلیکاتور قطره خون را به طور یکنواخت پخش کرده تا دایره ای به قطر حدود ۱ سانتی متر 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 گونه ای باشد که نوشته های روزنامه از زیر آن به سختی خوانده شود.
- گسترش ضخیم نباید به وسیله مواد تثبیت کننده ثابت گردد.
- گسترش ضخیم ممکن است از باقی کوت نیز تهیه گردد (با استفاده از نمونه خون در ماده ضد انعقاد)

• گسترش نازک

- ۱- یک قطره خون (حدود ۰/۰۵ میلی لیتر) به فاصله حدود ۲ سانتی متر 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 می شود.
- 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 سریعاً در حرارت محیط خشک شود.
- ۵- گسترش خشک شده باید در محلول متانول به مدت چند ثانیه تثبیت گردد.
- ۶- گسترش نازک باید به گونه ای تهیه شود که در یک انتها ضخیم و در انتهای دیگر به حدی نازک باشد تا گلبول های قرمز با هم همپوشانی نداشته باشند.

نکته:

- باید از لام شیشه ای 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 می باشد.
- هر دو گسترش نیز می تواند بر روی یک لام تهیه گردد، در این صورت باید فضایی بین دو گسترش وجود داشته باشد به طوری که بتوان گسترش نازک را بدون آن که گسترش ضخیم را متاثر سازد تثبیت نمود.
- مشخصات بیمار باید با مداد سربی یا ماژیک غیر قابل شست و شو در ناحیه ضخیم گسترش نازک نوشته شود.

صفحه 12 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

- برای تسریع در عمل خشک شدن می توان از پنکه استفاده نمود (نباید از شعله یا منابع دیگر حرارتی استفاده شود).
- در مناطقی که رطوبت بالا است استفاده از گرمخانه 25°C جهت خشک نمودن لام ها پیشنهاد می گردد.

ادرار

نمونه ادرار برای بررسی های شیمیایی، سلول شناسی و میکروب شناسی مورد استفاده قرار می گیرد. نحوه نمونه گیری و ظروف جمع آوری ادرار از عوامل مهم در کیفیت نمونه می باشد.

نمونه ادرار باید در ظرف تمیز دهان گشاد با قطر حداقل ۱۰ سانتی متر، با اندازه مناسب و غیر قابل نشت، جمع آوری گردد. بهتر است ظرف جمع آوری ادرار یکبار مصرف بوده و در غیر این صورت 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 نمونه گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه های ادراری استفاده شود.

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

هنگامی که ارزیابی سلولی سدیمان ادراری مدنظر است باید مراحل آماده سازی ادرار هرچه سریع تر صورت گیرد. جهت تهیه رسوب ادرار باید نمونه در ظروف درپوش دار به مدت ۵ دقیقه در 400g سانتریفیوژ گردد.

در بررسی های میکروبیولوژیک در صورتی که نتوان نمونه را به سرعت به آزمایشگاه منتقل نمود و آزمایش کرد می توان آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای $4-8^{\circ}\text{C}$ نگهداری کرده و یا می توان از نگه دارنده های باکتریواستاتیک نیز استفاده نمود.

ظرف محتوی نمونه باید به درستی برچسب گذاری شود، اطلاعات مورد نیاز شامل: نام بیمار، زمان نمونه گیری، نام نگه دارنده، در موارد خاص ذکر نوع نمونه (کاتتر) می باشد. همچنین در صورتی که نمونه از محل دیگری ارسال گردد باید نحوه نگهداری و زمان دریافت نیز ذکر گردد.

حداقل حجم مورد نیاز جهت بررسی های معمول کمی و کیفی ادرار به طور متوسط ۱۲ میلی لیتر 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 جمع آوری 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 (۷-۱۰ صبح) جهت بررسی های کمی
- ۴- ادرار با زمان مشخص مثلا ادرار ۲۴ ساعته جهت بررسی های کمی
- ۵- ادرار تمیز (ادرار میانی، کاتتر و سوپراپوبیک)

* ادرار اتفاقی

این نمونه جهت آزمون غربالگری روزمره مورد استفاده قرار می گیرد و در هر موقع از روز قابل جمع آوری می باشد، ولی زمان نمونه گیری باید روی ظرف درج گردد. بهتر است قبل از جمع آوری ادرار فرد چند ساعت ادرار خود را تخلیه نکرده باشد. برای این منظور اولین ادرار صبحگاهی به دلیل غلظت مناسب و PH پایین مناسب تر است.

صفحه 13 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

* ادرار صبح گاهی (ادرار ۸ ساعته)

این نمونه معمولا در اول صبح پس از بیدار شدن فرد جمع آوری می گردد. این نمونه جهت بررسی پروتئین اوری اورتو استاتیک مناسب است. ابتدا شب قبل از خواب ادرار تخلیه شده و نمونه صبح پس از بیدار شدن فرد جمع آوری می گردد. در صورت تخلیه ادرار در طول شب، باید در ظرف جمع آوری نمونه ریخته شود.

* ادرار زمان دار

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

* ادرار ۲۴ ساعته

به دلیل تغییرات دوره ای ترشح مواد در ادرار، در بعضی مواقع نیاز است که ادرار ۲۴ ساعته جمع آوری گردد. به عنوان نمونه می توان از کاتکول آمین ها، ۱۷ هیدروکسی استروئید و الکترولیت ها نام برد که پایین ترین غلظت آن ها در صبح و بالاترین غلظت این ترکیبات در ظهر یا کمی پس از آن می باشد.

●● جمع آوری نمونه: ظرف نمونه باید پلاستیکی و دهان گشاد به گنجایش تقریبی ۳ لیتر باشد. جهت جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته ابتدا اولین ادرار صبحگاهی دور ریخته شده و در طی ۲۴ ساعت بعدی ادرار در ظرف نمونه گیری جمع آوری می شود به طوری که آخرین نمونه جمع آوری 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 نمونه گیری نیز یادداشت گردد و در صورت استفاده از ماده نگه دارنده درج نام ماده نیز ضروری است. در طول مدت جمع آوری، ظرف نمونه باید در یخچال یا درون یخ نگهداری شود. ممکن است جهت ادرار ۲۴ ساعته از مواد نگه دارنده استفاده گردد که با توجه به خطر زیستی این مواد، باید هشدارهای لازم به بیمار داده شود.

* ادرار تمیز

جهت بررسی های باکتری شناسی از نمونه ادرار تمیز استفاده می شود.

●● نحوه جمع آوری نمونه

بیمار ابتدا دست های خود را با آب و صابون شسته و سپس ناحیه تناسلی خود را با پنبه آغشته به آب و صابون تمیز می نماید، بخش اول ادرار را دور ریخته و بخش میانی ادرار را با رعایت شرایط استریل در درون ظرف جمع آوری ادرار می ریزد و سپس بقیه ادرار را دور می ریزد.

●● ادرار تهیه شده توسط کاتتر و فوق عانه (سوپراپوبیک) نیز از روش هایی هستند که جهت جمع آوری ادرار استریل در مواقع خاص و با درخواست پزشک تهیه می شوند.

●● جهت نمونه گیری از نوزادان و اطفال باید از کیسه جمع آوری ادرار استفاده نمود. در صورتی که بیمار در خواست کشت ادرار نیز داشته باشد، باید نواحی شرمگاهی و پرینه آل 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 جمع آوری، ادرار باید در ظرف دیگری نگهداری شود.

صفحه 14 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

• 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.

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

➤ نگهداری و انتقال نمونه

- جهت انتقال نمونه باید درب ظرف کاملاً محکم باشد تا امکان نشت نمونه به خارج از ظرف و محیط اطراف به حداقل برسد (در صورت امکان جهت انتقال می توان ظرف نمونه را درون ظرفی دیگری قرارداد).
- نمونه ادرار باید در سریع ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شده و حداکثر در ظرف ۲ ساعت در دمای اتاق بررسی گردد. در غیر این صورت باید نمونه پس از جمع آوری در یخچال نگهداری شود (دمای 8°C -۲).
- در بررسی های میکروبیولوژیک در صورتی که نتوان نمونه را به آزمایشگاه منتقل نمود و مورد بررسی قرارداد تمهیدات زیر باید صورت گیرد:
- •• نمونه را می توان به مدت ۲۴ ساعت در دمای 8°C -۲ تا قبل از کشت نگهداری نمود.
- •• می توان قسمتی از نمونه ادرار را جهت بررسی های بیوشیمیایی در ظرف دیگری که حاوی نگه دارنده باکتريو استاتیک است، نگهداری نمود.

مدفوع

- مدفوع نمونه مناسبی جهت تشخیص عوامل پاتوژن مولد اسهال باکتریایی، ویروسی و انگلی است. نمونه گیری 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 نمونه گیری از عواملی هستند که رعایت آن ها در شناسایی عامل پاتوژن بسیار کمک کننده است. جهت جمع آوری نمونه مدفوع باید مواردی را در نظر داشت که به برخی از آن ها در زیر اشاره می گردد:
- •• بیمار نباید از ۱۵ روز قبل از نمونه گیری آنتی بیوتیک (نظیر تتراسایکلین و سولفانامید)، داروهای ضد تک تاخته، بیسموت، سولفات باریم، ترکیبات کائولین، روغن کرچک، هیدروکسید منیزیم یا هرگونه داروی ملین مصرف کرده باشد.
- •• تعداد دفعات نمونه گیری بر اساس درخواست پزشک می باشد.
- •• 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 جمع آوری شده مناسب است.
- •• نباید در یک روز بیش از یک نوبت نمونه از بیمار گرفته شود.
- •• نمونه گیری در بیمارانی که بیش از سه روز بستری شده اند توصیه نمی شود.
- •• در نوزادان و اطفال می توان از سواب رکتال در محیط انتقالی استفاده نمود ولی این کار معمولاً برای تشخیص ویروس ها و عوامل انگلی پیشنهاد نمی شود.

صفحه 15 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

● 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.

* **سوپا مقعدی:** سوپا را با فروبردن در محیط انتقالی سترون، مرطوب کرده به اندازه ۲-۳ سانتی‌متر در داخل اسفنج‌ترکتوم فرو برده و بچرخانید. سوپا را بیرون کشیده پس از اطمینان از آغشتگی به مدفوع، سریعاً 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 سوپا به مخاط انتهایی روده جهت جمع‌آوری نمونه بسیار مهم است.

* **سوپا 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 سوپا سر پنبه‌ای یا سر پلی‌استری به‌درون مدفوع سریعاً 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 نمونه‌گیری کشت داد، باید در محیط انتقالی قرار داده و سریعاً در یخچال نگهداری نمود.

●● محیط انتقالی حاوی سوپا مدفوع یا مقعد را می‌توان حداکثر ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۴°C نگهداری کرد. در غیر این‌صورت این محیط می‌بایست ترجیحاً 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.

صفحه 16 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

• نمونه گیری جهت عوامل انگلی

➤ جمع آوری نمونه

- برای انجام این آزمایش حداقل ۵ گرم مدفوع در ظرف دهان گشاد در پیچدار تمیز و خشک مورد نیاز است (در صورت آبی بودن مدفوع معادل ۵ سی سی).
- در صورتی که نتوان فاصله زمانی مناسب بین جمع آوری نمونه تا انجام آزمایش را رعایت نمود باید نمونه در ماده نگهدارنده جمع آوری 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 ارگانیسم های دارای زندگی آزاد شود. ادرار نیز سبب تخریب تروفوزوئیت ها می شود. ترجیحا نباید نمونه از کاسه توالت جمع آوری گردد.
- چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته خیلی زود از بین می رود، ثبت تاریخ و ساعت نمونه گیری ضروری است.

➤ نگهداری

- نمونه باید هر چه سریع تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در صورت تاخیر بیش از ۲ ساعت، نمونه در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگهداری شود.
- توجه: جهت آزمایش های شیمیایی (مانند خون در مدفوع) به ۵۰ گرم مدفوع نیاز می باشد.

مایع مغزی نخاعی (Cerebro-Spinal Fluid (CSF

- جمع آوری مایع مغزی نخاعی توسط پزشک و به روش پونکسیون نخاعی (Lumber Puncture=LP) و به صورت کاملا استریل انجام می گیرد.
- معمولا مایع جهت آزمون های شیمیایی، میکروبیولوژیک و آنالیز سلولی در ۳ تا ۴ لوله جمع آوری می شود.
- جهت آزمون های باکتری شناسی نمونه باید در لوله درپوش دار و استریل جمع آوری گردد. لوله ها بر اساس ترتیب جمع آوری برچسب گذاری می شوند (لوله شماره ۱ جهت آزمایش های بیوشیمیایی، لوله شماره ۲ جهت آزمایش های میکروب شناسی، لوله شماره ۳ جهت بررسی سلولی).
- جهت جمع آوری نمونه نیازی به ماده ضد انعقاد نمی باشد زیرا مایع مغزی نخاعی لخته نمی شود، مگر آن که نمونه گیری همراه با صدمه باشد (نمونه گیری 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 ۱ صورت می گیرد.
کشت و رنگ آمیزی گرم	-	۳-۵	لوله شماره ۲
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی	-	۳-۵	لوله شماره ۳ یا ۴
سایر بررسی ها (سیتولوژی)	-	۳-۵	لوله شماره ۴

صفحه 17 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

نمونه باید در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردد. دژنراسیون سلولی در طی یک ساعت اتفاق می افتد، لذا حداکثر زمان گردش کاری نباید بیش از ۱ ساعت به طول انجامد. نقل و انتقال نمونه در دمای اتاق صورت می گیرد. جهت آزمون های 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 می باشد. جهت نگهداری طولانی مدت، نمونه ابتدا سانتریفیوژ شده پس از جداسازی سلول ها، مایع-رویی در ظرف درپوش دار شیشه ای یا پلی پروپیلن در دمای (-70°C) قابل نگهداری است. جهت مطالعات سیتولوژیک رسوب CSF باید بلافاصله پس از جمع آوری به وسیله سانتریفیوژ مخصوص (۲۰ دقیقه در 1800g) تهیه و به آزمایشگاه ارسال شود.

مایع سروز

مایعات سروزی نظیر مایع جنب و صفاقی را می توان در یک لوله جمع آوری و سپس در محل نمونه گیری یا آزمایشگاه به لوله های مختلف و با حجم های کمتر تقسیم نمود. قابل ذکر است که نمونه قبل از تقسیم و شمارش سلولی باید کاملاً مخلوط گردد. EDTA ضد انعقاد پیشنهادی در خصوص شمارش و افتراق سلولی است. جهت شمارش و افتراق سلولی، نمونه ها تا ۲۴ ساعت در دمای $4-2^{\circ}\text{C}$ قابل نگهداری هستند. در خصوص بررسی-های میکروبی نمونه باید در ظرف استریل جمع آوری گردد. جهت بررسی سیتولوژی ممکن است نمونه در حجم های متفاوت به آزمایشگاه ارسال گردد (۱۰۰-۱۵ میلی-لیتر) ولی حجم پیشنهادی ۵۰ میلی لیتر است و نیاز به استفاده از لوله های استریل و ماده ضد انعقاد نیز نمی باشد. البته می توان 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)
اندازه گیری پروتئین، توتال، لاکتات، دهیدروژناز، گلوکز و آمیلاز	هپارین یا بدون ضد انعقاد	۵-۸
کشت و رنگ آمیزی گرم	سدیم پلی سولفانات (SPS) یا بدون ضد انعقاد یا ضدانعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۸-۱۰
شمارش سلولی (گلوبول قرمز و سفید) و تشخیص افتراقی	EDTA	۸-۱۰
کشت باکتری اسید فست	SPS یا بدون ضد انعقاد یا ضد انعقاد بدون اثر باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۱۵-۵۰
رنگ آمیزی PAP- بلوک سلولی	بدون ضدانعقاد، هپارین یا EDTA	۱۵-۵۰

مایعات سروزی باید در اسرع وقت و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شوند. بررسی های سیتولوژی نیز باید هر چه سریع تر صورت گیرند، و در صورت نیاز می توان نمونه را در دمای 4°C و بدون ماده تثبیت کننده تا چند روز نگهداری نمود.

صفحه 18 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

مایع سینوویال

حجم نمونه جهت بررسی های آزمایشگاهی بسته به اندازه مفصل و نوع مایع تجمع یافته در مفصل متفاوت است. معمولاً حجم ۳-۵ میلی لیتر ایده‌آل 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 بررسی های آزمایشگاهی باید به خوبی مخلوط گردد. در بعضی از مراجع ذکر شده که ضد انعقاد لیتیم هپارین و EDTA به دلیل ایجاد کریستال در نمونه و امکان اشتباه با کریستال های 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 مورد نیاز (میلی لیتر)	ملاحظات
شمارش سلولی و تشخیص افتراقی، کریستال ها، انکلوژیون ها	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	ترجیحاً 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 میلی لیتر نمونه است.
کشت	SPS، بدون ضدانعقاد یا ضد انعقاد بدون اثرباکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی	۳-۵	نیاز به لوله استریل است.

نمونه های دستگاه تنفسی

بهترین زمان جمع آوری نمونه در اکثر عفونت های تنفسی در طول ۳ روز اول ایجاد علائم بیماری می باشد. نمونه ها بسته به محل عفونت، از قسمت فوقانی و تحتانی دستگاه تنفسی جمع آوری می شوند. عوامل بیماری زای دستگاه تنفسی فوقانی (ویروسی و باکتریایی) در نمونه های گرفته شده از قسمت نازوفارنژیال گلو و عوامل بیماری زای دستگاه تنفسی تحتانی در نمونه خلط قابل بررسی هستند. کشت ارگانایسم هایی نظیر لژیونلا مشکل است لذا بهتر است که تشخیص بر اساس شناسایی آنتی ژن های جدا شده از ادرار باشد. در صورت شک به التهاب حاد اپیگلوت، نمونه گیری از گلو یا فارنژیال نباید صورت گیرد زیرا استفاده از این شیوه ممکن است سبب انسداد شدید تنفسی شود. معمولاً التهاب اپیگلوت به وسیله رادیوگرافی گردن تایید می گردد ولی عوامل اتیولوژیک ایجاد کننده آن ممکن است از کشت خون هم جدا گردند.

● دستگاه تنفسی فوقانی

●● نمونه برداری از گلو و لوزه ها

از بیمار خواسته می شود تا دهان خود را باز نماید و با آبلانگ زبان وی را به پایین فشار داده، برای مشاهده نواحی ملتهب و آگزودا از چراغ قوه استفاده می شود. سوآپ استریل داکرونی یا آلژینات کلسیم را چندین بار بر روی نواحی

صفحه 19 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت

مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی

ملتهب و اگزودای حلق می کشیم. باید توجه شود که سواب با سطح داخلی حفره دهانی تماس پیدا نکند. چنانچه سواب در طی ۲-۱ ساعت پس از نمونه گیری مورد آزمایش قرار نگیرد در یک لوله استریل درپوش دار حاوی محیط انتقالی باکتریایی یا ویروسی قرار داده می شود (انتهای سواب که با دست در تماس بوده باید شکسته شود و درپوش در جای خود قرار گیرد).

جهت تهیه گسترش مستقیم با سواب استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه گیری صورت می گیرد.

●● نمونه برداری از انتهای بینی و نازوفارنکس

به وسیله یک سواب انعطاف پذیر استریل وارد سوراخ بینی شده و از نازوفارنکس نمونه تهیه گردد. سر بیمار باید کمی به عقب برده شود. در افراد بالغ سواب را حدود ۵-۶ سانتی متر وارد بینی کرده تا مطمئن شوید که سواب وارد ناحیه خلفی فارنکس شده است، در همان وضعیت سواب را چند ثانیه نگه داشته و سپس به آرامی بچرخانید. از هر سوراخ بینی دو سواب گرفته می شود که یکی جهت گسترش مستقیم و دیگری جهت کشت استفاده می گردد.

➤ آسپیراسیون نازوفارنکس

این روش در کودکان و نوزادان از سواب راحت تر و کارآمدتر است. با کاتتر سیلیکون ترشحات را آسپیره نمایید.

● دستگاه تنفسی تحتانی

➤ روش جمع آوری خلط

یک نمونه خلط مناسب حاوی مواد ترشحاتی حاصل از ریه ها پس از سرفه عمیق است (نمونه حاوی آب دهان، ترشحات حلق و بینی مناسب نمی باشد).

●● زمان نمونه گیری

به دلیل این که تعداد باسیل سل دفع شده در زمان های مختلف متفاوت می باشد، آزمایش یک نمونه خلط برای تشخیص کفایت نمی کند و حتما باید سه نمونه تهیه گردد. برای تهیه نمونه بیمار باید ناشتا باشد. در خصوص تعداد نمونه جمع آوری شده جهت سایر عوامل باکتریایی یک نمونه کفایت می کند ولی در صورت شک به وجود عوامل قارچی و عفونت مایکوباکتریوم سه نمونه جداگانه صبحگاهی مناسب می باشد. نمونه اول: در اولین مراجعه بیمار به واحد درمانی تهیه می گردد و ظرف جهت نمونه گیری دوم نیز تحویل داده می شود.

نمونه دوم: خلط صبحگاهی که بیمار قبل از برخاستن از جای خود و به صورت ناشتا در منزل تهیه می نماید. نمونه سوم: خلط صبحگاهی که همزمان با مراجعه بیمار برای تحویل نمونه دوم از بیمار گرفته می شود. نمونه باید در ظرف دهان گشاد از جنس پلاستیک قابل سوختن شفاف و محکم با قطر حدود ۷-۵ سانتی متر جمع آوری گردد (نمونه داخل آن از نظر مقدار و کیفیت قابل رویت بوده و همچنین به راحتی سوزانده و معدوم گردد). جهت جلوگیری از نشت خلط از داخل ظرف به بیرون، باید از ظرف در پیچ دار استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به ظرف پلاستیکی با مشخصات فوق می توان از ظروف شیشه ای دهان گشاد در پیچ دار استفاده نمود (با رعایت اصول استریلیزاسیون).

➤ نحوه نمونه گیری

بیمار صبح ناشتا در فضای باز ابتدا یک نفس عمیق کشیده و با سرفه های عمیق خلط را درون ظرف (در حالی که ظرف نزدیک لب های بیمار قرار دارد) تخلیه می کند. سپس درب آن را بسته و در کیسه نایلونی قرار می دهد. بهتر است حجم خلط بین ۳-۵ میلی لیتر باشد.

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

صفحه 20 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

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

➤ **نگهداری:** باید نمونه هر چه سریع تر به آزمایشگاه ارسال گردد. در غیر این صورت در محل خنک (ترجیحا در یخچال) نگهداری شود.

- همه نمونه های تنفسی به جز خلط، باید در محیط کشت انتقالی مناسب باکتری ها/ ویروس ها منتقل گردند.
- نمونه های باکتریایی تا مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و ویروس ها در محیط انتقالی مناسب در دمای $4-8^{\circ}\text{C}$ قابل انتقال می باشند.

جمع آوری نمونه چشم

سواب ها و گسترش های قرنیه و ملتحمه نمونه های معمول جهت تشخیص کوئزکتیویت حاد ناشی از عوامل باکتریایی و ویروسی می باشند. تمام نمونه های گرفته شده از ترشحات قرنیه و ملتحمه باید از نظر این که از چشم چپ یا راست تهیه شده، برچسب گذاری گردند. جهت جمع آوری این نمونه ها باید شرایط استریل رعایت گردد. قبل از نمونه برداری بیمار نباید دارو یا قطره ای استفاده کرده باشد. قابل ذکر است که نمونه برداری از تراشه های قرنیه باید توسط پزشک متخصص چشم صورت گیرد.

روش جمع آوری سواب های ملتحمه

مراحل جمع آوری سواب های ملتحمه به شرح زیر است:

- ۱- پوست اطراف چشم را با یک ماده ضد عفونی کننده ملایم تمیز کنید.
- ۲- سواب استریل آلژینات کلسیم یا نخی را در سرم استریل مرطوب کرده و به طور دورانی بر روی ملتحمه بمالید.
- ۳- سواب را در لوله در پیچ دار حاوی محیط انتقالی مناسب قرار دهید.
- ۴- بر روی لوله مذکور علاوه بر نام بیمار، نوع نمونه و زمان جمع آوری نمونه نیز ذکر گردد.
- ۵- از سواب ملتحمه نیز دو گسترش بر روی یک لام تهیه می گردد. این کار بهتر است در محل نمونه برداری صورت گیرد. جهت شناسایی کلامیدیا مهم است که گسترش ها در محل نمونه برداری و قبل از انتقال تهیه شود. گسترش ها برچسب گذاری شده و نباید در دمای یخچال نگهداری شده یا منجمد گردند.

● نقل و انتقال نمونه

نمونه جهت شناسایی باکتری های پاتوژن در دمای محیط، در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می شوند.
 نمونه جهت شناسایی ویروس های پاتوژن در دمای $2-8^{\circ}\text{C}$ در محیط انتقالی مناسب انتقال داده می شوند.
 گسترش های تهیه شده در هوا خشک شده و در دمای محیط در جعبه لام منتقل می شوند.

تهیه نمونه جهت کشت خون

ضروری است دقت بیشتری جهت ضد عفونی کردن محل نمونه گیری صورت گیرد. ابتدا موضع با الکل ۷۰٪ تمیز شده سپس با محلول povidne-iodine ۱۰-۱٪ (یا کلرهگزیدین گلوکونات) ضد عفونی شده و پس از خشک شدن موضع مجدداً جهت حذف ید و کلرهگزیدین با الکل تمیز می گردد. کلرهگزیدین گلوکونات جهت نوزادان دو ماهه و بزرگ تر و هم چنین بزرگسالان دارای حساسیت نسبت به ید پیشنهاد می گردد. به دنبال خون گیری

صفحه 21 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

باید خون در عرض ۱ دقیقه به محیط کشت تلقیح شود. درب شیشه های کشت خون نیز باید قبل از تلقیح با الکل ۷۰٪ و سپس با محلول povidne-iodine ۱۰-۱٪ (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 ۱-۳ میلی لیتر ختون کافی می باشد. این مقدار خون در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت خون رقیق می گردد.
- بزرگسالان: حجم خون جمع آوری شده به میزان ۵-۱۰ میلی لیتر است که در ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت خون رقیق می گردد.

• روش خنثی سازی عوامل ضد میکروبی در خون

با اضافه نمودن مهار کننده های شیمیایی نظیر سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) ۰/۰۵-۰/۰۲۵٪ به محیط کشت و رقیق سازی خون، ویژگی های باکتریسیدال خون و آنتی بیوتیک های احتمالی خنثی می گردد. قابل ذکر است که سدیم پلی آنتول سولفانات (SPS) فعالیت های ضد فاگوسیتی، ضد کمپلمانی، ضد انعقادی و ضد لیزوزمی دارد و اگر این ماده در مقادیر خیلی بالا استفاده شود، اثر مهار کنندگی در رشد میکروب ها خواهد داشت.

• کشت مجدد

- شیشه های کشت خون را ظرف ۲۴-۶ ساعت (صرف نظر از وجود علائم رشد) کشت مجدد داده و سپس تا هفت روز هر روز بررسی کنید. هر نوع کدورت یا لیز گلبول های قرمز ممکن است نشانگر رشد میکروبی باشد و به طور حتم باید بلافاصله کشت مجدد انجام شود.
- قابل ذکر است که ممکن است علی رغم عدم وجود کدورت، رشد میکروبی وجود داشته باشد، لذا ضروری است در فواصل ۲۴-۶ 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 میلی لیتر از نمونه را به محیط آگار انتخاب شده منتقل کنید.

نمونه برداری از مجاری ادراری تناسلی مردان

با دو سواپ استریل از ترشحات چرکی نمونه برداری کنید. یکی از سواپ ها جهت تهیه گسترش و دیگری جهت کشت مورد استفاده قرار می گیرد. در صورتی که ترشحاتی مشهود نباشد با سواپ نازک به اندازه ۲-۳ سانتی متر درون مجرا وارد شده و قبل از بیرون آوردن در مجرا چرخانده شود. در صورتی که آزمایش با تاخیر انجام گیرد، سواپ باید در محیط انتقالی نگهداری شود.

نمونه برداری از دهانه رحم - ترشحات واژن

جهت نمونه گیری ابتدا سرویکس با کمک اسپیکولوم که با آب گرم مرطوب شده مشاهده می شود (بدون استفاده از مواد Lubricant). قبل از نمونه گیری باید تمامی ترشحات از دهانه خارجی رحم پاک شود. با یک سواپ استریل تا حدود ۲-۳ سانتی متر 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 درپوش دار استریل قرار گیرد. سواپ باید فوراً در

صفحه 22 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

محیط کشت مناسب کشت داده شود و یا به کمک محیط انتقالی به آزمایشگاه ارسال گردد. جهت تهیه گسترش مستقیم با سوآپ استریل دیگری به روش ذکر شده نمونه گیری صورت می گیرد.

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

در صورت مشکوک بودن به ناپسریا نمونه پس از تهیه سریعاً در دمای اتاق به آزمایشگاه ارسال می شود. سوآپ های آلژینات کلسیم و بعضی سوآپ های پنبه ای مهار کننده ناپسریا بوده، لذا بهتر است از سوآپ داکرون یا ریون استفاده شود.

جمع آوری نمونه جهت ضایعات پوستی

در اکثر ضایعات پوستی تشخیص ممکن است بر اساس مشاهده ظاهری و تاریخچه ی بیماری بدون جمع آوری نمونه های تشخیصی صورت گیرد. در مشاهده ظاهری ضایعه، نکات مهمی از قبیل نوع ضایعه پوستی (اریتماتوس، ماکولار، پاپولار، ماکولوپاپولار، وریکولار، 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 جمع آوری نمونه از راش ها یا ضایعات پوستی نیاز باشد. در موارد راش های وریکولار، نمونه ها جهت بررسی میکروسکوپی و کشت نمونه مستقیماً از وریکول ها تهیه می گردد. در خصوص سایر ضایعات اگزانتوماتو (ماکولار یا پاپولار) ممکن است تشخیص بیشتر بر پایه سایر روش ها، نظیر کشت خون و سرولوژی صورت گیرد.

در موارد مشکوک به آنتراکس پوستی یا ضایعات خیارکی ممکن است نمونه ها از زخم های پوستی و همچنین نمونه برای کشت خون تهیه شود.

• روش جمع آوری

* راش های وریکولو - پوستولار (جهت تشخیص عفونت های ویروسی)

زخم یا وریکول تازه و رسیده را با اتانول ۷۰٪ تمیز نمایید.

وزیکول: سرنگ توپرکولین با سوزن ۲۶-۲۷ را در حالی که سر سوزن آن به سمت بالا قرار دارد، در پایه وریکول وارد کنید.

مایع را آسپیره نموده و با دقت به داخل ظرف حاوی ۱-۲ میلی لیتر محیط انتقال ویروسی تخلیه نمایید (یکبار سرنگ را با محیط انتقالی شست و شو دهید).

زخم: پوسته زخم را بالا آورده و به کمک سوآپ استریل داکرونی بر روی پایه زخم بمالید (سوآپ 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 لانتست و فورسپس یکبار مصرف، کبره ها را از محل خودش جدا نمایید.
- ۵-۱۰ لایه کبره را برداشته و در ظرف پلاستیکی در پیچ دار قرار دهید.
- اگر مشکوک به آنتراکس جلدی هستید، مایع وریکولی زیر محل زخم نمونه تشخیصی بهتری نسبت به تکه های زخم می باشد.

صفحه 23 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

• آسپیراسیون آبسه ها

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

• انتقال نمونه

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

• نگهدارنده ها، ضد انعقادها و مواد افزودنی

مواد نگهدارنده جهت نمونه های خون، ادرار، مغز استخوان، مدفوع و مایعات بدن استفاده می گردند.

• ضد انعقادهای رایج جهت نمونه خون

- ضد انعقادهای رایج مورد استفاده جهت نمونه خون شامل موارد زیر می باشند:
- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سیترات سدیم، هپارین، سدیم پلی سولفانات (SPS)، فلوراید سدیم و اسید سیترات دکستروز (ACD) می باشد.
- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) که به اشکال نمک های سدیم و پتاسیم و لیتیم موجود است. مورد استفاده آن در بخش های خون شناسی، بیوشیمی و بانک خون می باشد. جهت شمارش سلول های خونی و تشخیص افتراقی نمک پتاسیک آن توصیه می گردد.
- سیترات سدیم جهت آزمون های انعقادی و سرعت رسوب گلبولی کاربرد دارد.
- هپارین به فرم نمک های لیتیم و سدیم در اندازه گیری بسیاری از پارامترهای خون و بررسی های ایمونولوژیک به همراه آزمون مقاومت گلبولی کاربرد دارد.
- فلوراید سدیم جهت اندازه گیری گلوکز کاربرد دارد.
- سدیم پلی سولفانات به عنوان ضد انعقاد جهت شیشه های کشت خون استفاده می گردد.
- اسید سیترات دکستروز به عنوان ماده ضد انعقاد در کیسه های خون در انتقال خون کاربرد دارد.

• نگهدارنده ها در خصوص نمونه های ادرار و مدفوع

- انواع نگهدارنده ها در خصوص نمونه های ادرار و مدفوع به شرح زیر می باشد:
- جهت کشت ادرار و شمارش کلنی اسید بوریک مناسب می باشد. 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 سریعاً به آزمایشگاه ارسال نمود تا ۲ ساعت در دمای ۴°C قابل نگهداری است، در غیر این صورت نمونه ها را می توان در محیط های نگهدارنده و انتقالی نظیر استوارت، آمیس و کری بلر منتقل نمود. در بعضی مواقع می توان با اضافه نمودن زغال به محیط استوارت و آمیس

صفحه 24 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

اسیدهای چرب موجود در سواپ های پنبه ای، که بازدارنده ارگانایسم های سخت رشد نظیر نایسریا گونوره و بوردتلا پرتوسیسی می باشند را جذب نمود.

- مدفوع از نظر توکسین کلستریدیوم دیفیسیل باید بدون مواد نگهدارنده جمع آوری گردد و این نمونه تا ۴۸ ساعت در دمای 4°C قابل نگهداری است. در صورت تاخیر بیشتر، نمونه باید در دمای 70°C - نگهداری گردد.
- نگهدارنده مناسب جهت تخم انگل، تروفوزیت و کیست تک یاخته فرمالین ۱۰٪، پولی وینیل الکل و سدیم استات فرمالین (Sodium Acetate Formalin = SAF) است.

• مواد ضد انعقاد در بررسی های میکروبیولوژی

- جهت جلوگیری از ایجاد لخته در نمونه های خون، مغز استخوان و مایع سینوویال از مواد ضد انعقاد استفاده می شود. باند شدن میکروارگانایسم ها به لخته، شناسایی آن ها را مشکل می سازد، لذا استفاده از ضد انعقاد ضروری است. انتخاب نوع و غلظت ضد انعقاد به دلیل اثر ضد میکروبی بعضی از آن ها از اهمیت زیادی برخوردار است.
- سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) معمول ترین ضد انعقاد مورد استفاده جهت نمونه های میکروبی می باشد. غلظت مورد استفاده نباید بیشتر از ۰/۰۲۵ (وزنی/حجمی) باشد. گونه های نایسریا و بعضی باکتری های بی هوازی به غلظت های بالای سدیم پلی آنتول سولفات (SPS) حساس هستند. نسبت نمونه به ضد انعقاد سدیم پلی آنتول سولفات بسیار مهم است، لذا لازم است حجم های متفاوت از ضد انعقاد در لوله با سایز بزرگ (جهت نمونه بزرگسال) و کوچک (جهت نمونه اطفال) و همچنین جهت مقادیر کم ارگانایسم در نمونه های مغز استخوان و مایع سینوویال موجود باشد.
- هپارین دیگر ماده ضد انعقاد متداول می باشد و اغلب جهت کشت ویروسی و جداسازی گونه مایکوباکتریوم از خون مورد استفاده قرار می گیرد. البته هپارین مهارکننده رشد باکتری های گرم مثبت و قارچ هاست. سیترات سدیم و EDTA جهت نمونه های میکروبیولوژیک نباید مورد استفاده قرار گیرد.

نگهداری نمونه

- در صورتی که نتوان نمونه ها را در اسرع وقت پس از دریافت نمونه مورد بررسی قرار داد، باید آن ها را در شرایط مناسب نگهداری کرد. دماهای متفاوت مورد استفاده، دمای اتاق (22°C)، دمای یخچال (4°C)، دمای بدن (37°C) و دمای فریزر (20°C - یا 70°C -) می باشند که بسته به نوع محیط انتقالی (در صورت استفاده) و عامل اتیولوژیک عفونت متفاوت است.
- بعضی نمونه ها نظیر ادرار، مدفوع، نمونه جهت بررسی عوامل ویروسی، خلط، سواپ ها (به غیر از عوامل بی هوازی)، وسایل خارجی نظیر کاتتر را می توان در دمای 4°C نگهداری نمود.
- پاتوژن هایی که به سرما حساسند باید در دمای اتاق نگهداری شوند. این عوامل ممکن است در نمونه هایی که حاوی باکتری های بی هوازی بوده و همچنین در اکثر مایعات استریل بدن، نمونه های ژنیال، سواپ گوش و چشم نیز موجود باشند.
- سرم جهت بررسی های سرولوژیک تا یک هفته در دمای 20°C - قابل نگهداری است.
- نگهداری طولانی مدت بافت ها یا نمونه ها در دمای 70°C - صورت می گیرد.
- مایع مغزی نخاعی در صورتی که سریعاً مورد بررسی قرار نگیرد تا ۶ ساعت در دمای 35°C قابل نگهداری است. جدول ۳-۴ شرایط نگهداری نمونه های مختلف را نشان می دهد.

صفحه 25 از 26	دستورالعمل	 آزمایشگاه مرجع سلامت
	مدیریت نمونه در آزمایشگاه های پزشکی	

جدول ۳-۴: شرایط نگهداری نمونه

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

موارد رد نمونه

موارد رد نمونه به شرح زیر بیان می گردد:

- عدم همخوانی اطلاعات برگه درخواست آزمایش و برچسب روی نمونه
 - استفاده از محیط انتقالی نامناسب
 - جمع آوری نمونه در ظرفی که دارای نشت است
 - نمونه ناکافی
 - زمان انتقال بیش از ۲ ساعت در نمونه های بدون مواد نگهدارنده
 - انتقال نمونه در دمای نامناسب
 - خشک شدن نمونه
 - دریافت نمونه در محلول فیکساتیو نظیر فرمالین (نمونه مدفوع مستثنی می باشد)
 - درخواست کشت بی هوازی بر روی نمونه هایی که باکتری های بی هوازی فلور طبیعی آنهاست. (مثل واژن، دهان)
 - نمونه حاصل از کاتتر فولی
 - بیش از یک نمونه با یک منشا از یک مریض در همان روز (به غیر از موارد کشت خون)
 - نمونه سواپ با درخواست های متعدد برای ارگانیسیم های مختلف
 - نمونه خلط که در رنگ آمیزی گرم کمتر از ۲۵ سلول سفید و بیش از ۱۰ سلول اپی تلیال در بزرگ نمایی پایین داشته باشد.
- در جدول ۳-۵ تحت عنوان مدیریت نمونه و راهنمای برخورد با آن به طور خلاصه مباحث این فصل بیان گردیده است.