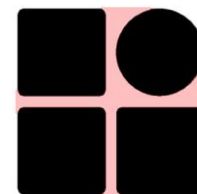


راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه های بالینی جهت تشخیص مقاومت دارویی HIV

آزمایشگاه جامع سلامت

ویرایش دوم

مرداد ماه سال ۱۳۹۹



۱- مقدمه:

این راهنما روش استاندارد جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه های بالینی جهت تشخیص مقاومت دارویی HIV را بیان می کند. با توجه به اینکه نمونه گیری در محلی غیر از آزمایشگاه تشخیص مقاومت دارویی HIV صورت می گیرد نمونه ها باید تحت شرایط مندرج در این دستورالعمل ارسال شوند.

۲- هدف:

هدف تشخیص مقاومت دارویی ویروس HIV در نمونه های بالینی ارسال شده می باشد.

۳- تعاریف:

* **خون کامل:** نمونه خون که جداسازی پلاسما (از طریق سانتریفیوژ) روی آن صورت نگرفته است.

* **پلاسما:** پلاسما مایعی شفاف متمایل به زرد و فاقد سلولهای خونی بوده و پس از سانتریفیوژ کردن نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد در قسمت بالای لوله ایجاد می گردد.

* **سرم:** سرم بخش مایع خون پس از لخته شدن است که بدنبال سانتریفیوژ کردن نمونه خون فاقد ماده ضد انعقاد در قسمت بالای لوله ایجاد می گردد.

فرق اصلی سرم با پلاسما در این است که برخلاف پلاسما سرم خون فاقد پروتئین های انعقادی مانند فیبرینوژن است. سایر پروتئین ها، آنتی ژن ها، آنتی بادی ها، آنزیم ها و الکترولیت های خون در سرم موجودند.

۴- جمع آوری نمونه :

نمونه مناسب برای تشخیص مقاومت دارویی HIV با روش NGS و با استفاده از کیت **Sentosa® SQ HIV Genotyping** پلاسما می باشد.

نمونه ها باید به روش مناسب جمع آوری و آزمایش شده و در شرایط مناسب نگهداری شوند تا بتوان نتایج صحیح و قابل اطمینانی بدست آورد.

۴-۱ وسایل مورد نیاز جهت نمونه گیری

- سرنگ ۱۰ سی سی
- پد الکلی
- گارو
- لوله در پوش دار حاوی EDTA
- برچسب
- جالوله ای پلاستیکی
- چسب ضد حساسیت نمونه گیری
- دستکش لاتکس



• ظروف ایمن (safety box)

توجه: استفاده از وسایل ایمنی برای فرد نمونه گیر نظیر ماسک، عینک، دستکش و روپوش مناسب الزامی است.

۲-۴ نحوه نمونه گیری

۱. کلیه لوازم مورد نیاز برای خونگیری را از قبل آماده نمایید.
۲. دستکش لاتکس بپوشید (برای حفاظت بیشتر ترجیحاً دو دستکش روی هم بپوشید).
۳. ابتدا باید از هویت فرد مورد آزمایش، اطمینان حاصل نمائید.
۴. قبل از نمونه گیری کد بیمار مندرج در پرونده را بطور دقیق و خوانا بر روی برچسب لوله ها نوشته و مطابقت دهید.
۵. فرد را بر روی صندلی مناسب بنشانید، بیمار دست خود را مشت نموده و گارو را ۷/۵-۱۰ سانتی متر بالای محل نمونه گیری ببندید و پس از ضدعفونی محل با پد الکلی و خشک شدن الکلی، نمونه گیری را در وضعیت نشسته انجام دهید (از ورید مدین کوبیتال و سفالیک دست). توجه داشته باشید به محض ورود خون بداخل سرنگ، گارو را باید باز کنید. همچنین پس از جاری شدن روان خون بداخل سرنگ باید فرد مشت خود را باز کند (حداکثر بمدت یک دقیقه می توان از گارو استفاده کرد).
۶. ۱۰ میلی لیتر خون وریدی بیمار را در دو لوله درپوش دار حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری نمایید. بعد از خون گیری موضع را از نظر بند آمدن خون کنترل نموده و با چسب ضد حساسیت بپوشانید.
۷. بدون گذاشتن درپوش، سرسوزن را در ظروف مقاوم (Safety Box) دفع نموده و از هرگونه بریدن و یا خم کردن سرسوزن ها خودداری نمائید.
۸. نمونه را بلافاصله در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته و به آرامی ۵-۱۰ بار بالا و پایین نموده و مخلوط نمایید. به هیچ عنوان نباید از ضد انعقاد هپارین استفاده شود.
۹. برچسب حاوی کد شناسایی را بر روی لوله ها نصب و با چسب شیشه ای روی برچسب آنرا فیکس نمائید.
۱۰. لوله ها را در جالوله ای قرار دهید.

۳-۴ نحوه جداسازی پلاسما برای تعیین مقاومت دارویی HIV با روش توالی یابی نسل جدید (NGS)

نمونه خون کامل را که در لوله درپوش دار حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) جمع آوری شده است را مطابق بروشور کیت **Sentosa® SQ HIV Genotyping** حداکثر ظرف مدت ۱ ساعت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۹۰۰ g سانتریفیوژ نمایید. سپس پلاسما را به میکروتیوب عاری از RNase و DNase منتقل کنید. نمونه پلاسما حداکثر تا مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است و برای نگهداری طولانی مدت، باید در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد قرار گیرد.



توجه : لازم است برای هر بیمار تعداد سه ویال نمونه پلاسما به طوری که هر ویال حاوی حجم حداقل ۱۰۰۰ میکرولیتر پلاسما در میکروتیوب های عاری از RNase و DNase باشد ارسال شود. حتما به این نکته توجه کنید که چنانچه حجم نمونه کمتر از ۷۵۰ میکرولیتر در میکروتیوب وجود داشته باشد نمونه با این سیستم قابل آزمایش نیست.

- برای انتقال پلاسمای جداسازی شده به میکروتیوب ها از سر سمپلر های فیلتر دار عاری از RNase و DNase استفاده شود.
 - از انجماد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری شود. انجماد و ذوب مکرر نمونه ها سبب ایجاد نتایج منفی کاذب می شود.
 - وجود همولیز، فیبرین و آلودگی میکروبی در نمونه، سبب نتایج نادرست می شود.
- ایکتريک و لیپمیک بودن نمونه سبب ایجاد تداخل در آزمایش های مولکولی خواهد شد. لذا پیش از نمونه گیری از نوزاد، از بالا نبودن بیلی روبین اطمینان حاصل شود و جهت جلوگیری از لیپمیک شدن پلاسما نیز بهتر است نمونه گیری حداقل ۲ ساعت پس از زمان شیر خوردن نوزاد صورت پذیرد.

۵- موارد رد نمونه

- هرگونه نشت نمونه به بیرون از میکروتیوب
- مخدوش بودن مشخصات برچسب نمونه
- عدم هم خوانی مشخصات ذکر شده در فرم با مشخصات برچسب و کد نمونه
- حجم کم نمونه (میزان پلاسما در هر یک از میکروتیوب ها نباید کمتر از ۷۵۰ میکرولیتر باشد)
- جمع آوری نمونه با استفاده از ضد انعقاد نامناسب مانند هپارین
- نگهداری و انتقال در دمای نامناسب

۶- انتقال نمونه های عفونی:

انتقال پلاسما باید در دمای ۱۵- تا ۳۰- درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۲۴ ساعت صورت پذیرد (از یخ خشک استفاده شود).

بسته بندی و انتقال نمونه ها باید در بسته بندی سه لایه ای مطابق با استاندارد های آزمایشگاه مرجع سلامت انجام شود که در ادامه شرح داده شده است.

انتقال نمونه های آلوده به آزمایشگاه، باید تحت شرایط استاندارد صورت گیرد. این روند باید با استفاده از ظروف مناسب، بسته بندی به روش استاندارد با درج علائم و برچسب های لازم روی بسته، رعایت اصول ایمنی جهت انتقال نمونه و در نظر داشتن شرایط مناسب جهت حفظ کیفیت و تمامیت نمونه صورت پذیرد.



۱-۶ بسته بندی نمونه ها

- بسته بندی کلیه نمونه ها می بایست به روش استاندارد و با استفاده از سه محفظه با شرح زیر صورت گیرد:
- نمونه ابتدا باید داخل یک میکروتیوب ۲- ۱/۵ میلی لیتری که غیرقابل نفوذ به مایعات و همچنین غیر قابل نشت بوده، قرار داده شود.
 - باید اطراف میکروتیوب های متعلق به هر بیمار، ماده جاذب الرطوبه مانند تکه های ابر و یا ماده مشابه گذاشت و سپس در محفظه دوم قرارداد، در واقع این مواد جاذب بین محفظه اول (میکروتیوب) و محفظه دوم قرار می گیرند تا در صورت هر گونه آسیب محفظه اول، مواد آلوده به محفظه بیرونی نشت ننماید. مقدار و حجم ماده جاذبی که بین محفظه اول و دوم قرار می گیرد باید متناسب با حجم نمونه باشد طوری که بتواند در صورت آسیب به میکروتیوب ها، کل حجم نمونه مایع را جذب نماید تا رطوبت به خارجی ترین محفظه نرسد.
 - پس از قراردادن محفظه اول در داخل محفظه دوم که باید مقاوم، غیرقابل نشت و غیرقابل نفوذ به مایعات باشد، می بایست مشخصات نمونه روی آن درج گردد. (می توان برای محفظه دوم از لوله فالكون ۵۰ میلی لیتری استفاده نمود)
 - در مرحله بعد محفظه دوم داخل محفظه سوم که مقاوم به ضربه و شرایط محیطی نامساعد بوده، قرار داده می شود. برای انتقال این نمونه ها باید از یخ خشک در داخل محفظه سوم استفاده شود.
- نکته:** به نسبت حجم یخ خشک مورد استفاده به حجم نمونه و زمان مورد نیاز برای انتقال توجه شود.
- نمونه پلاسما جهت بررسی HIV در گروه B (UN 3373) قرار دارد و مطابق شکل قرار داده شده در این دستورالعمل، بسته بندی شود.

۲-۶ برچسب گذاری

- کلیه بسته ها باید قبل از انتقال بطور مناسب برچسب گذاری شده طوری که حاوی اطلاعات لازم در خصوص ماهیت نمونه، خطرات آن و استانداردهای رعایت شده جهت بسته بندی باشد.
- اطلاعات مندرج روی بسته ها باید واضح و خوانا باشند و به گونه ای قرار گیرند که کاملاً قابل مشاهده بوده و توسط برچسب یا علامت دیگری پوشانده نشده باشد. روی محفظه خارجی (محفظه سوم) هر بسته باید اطلاعات زیر درج شود:

- نام و آدرس فرستنده یا ارسال کننده کالا
- نام و آدرس حمل کننده کالا
- شماره تلفن شخص مسئول تایید شرایط بسته بندی نمونه
- نام و آدرس دریافت کننده (گیرنده) کالا
- نوع نمونه
- شماره UN3373 و نام گذاری Biological Substance

- برچسب دارای علامت خطر زیستی (مربوط به مواد عفونی) باید به صورت لوزی شکل بر روی محفظه بیرونی الصاق شود به طوری که عبارت "گروه ۶" در قسمت پایین آن درج شده باشد.
- در صورت استفاده از یخ خشک، باید از UN1845 و برچسب مخصوص آن که مربوط به گروه ۹ و نام Miscellaneous dangerous substance است، استفاده شود.
- یخ خشک باید بین محفظه دوم و سوم قرار گیرد.
- باید وزن یخ خشک بر روی محفظه بیرونی درج شود.
- انتقال نمونه های عفونی به صورت شخصی و بوسیله افراد از طریق هوایی کاملاً غیر قانونی می باشد و صرفاً از طریق سیستم ارجاع، طبق دستور العمل آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی قابل قبول است.
- در صورت آسیب دیدن بسته بندی و یا نشت مواد باید فوراً به مسئولین مربوطه اطلاع داد.
- در شرایطی مسئولیت ارسال کننده نمونه به پایان می رسد که نمونه عفونی تحت شرایط استاندارد نگهداری و منتقل شده و ارسال کننده از دریافت آن توسط گیرنده مطمئن شود.

نمونه سیستم بسته بندی سه گانه یا سه لفافی و برچسب گذاری برای مواد عفونی گروه B

