

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

انتخاب نمونه برای تشخیص HIV وابسته به جمعیت، مکان، روش تشخیص و الگوریتم متفاوت می باشد. آزمایش بر روی پلاسما\*، سرم\*، خون کامل\*، DBS\* و بزاق قابل انجام 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.

گاهی نمونه گیری در محل انجام آزمایش صورت می گیرد و گاهی در محلی غیر از انجام آزمایش صورت گرفته و نمونه به آزمایشگاههای منطقه ای ارسال می گردد. شرایط نگهداری نمونه وابسته به نوع نمونه جمع آوری شده می باشد. سرم، پلاسما و DBS را می توان جمع آوری و نگهداری نمود و با تاخیر بر روی آن آزمایش انجام داد.

### جمع آوری نمونه خون وریدی

#### الف) وسایل مورد نیاز جهت نمونه گیری:

1. سرنگ 5 سی سی
2. پد الکلی
3. گارو
4. لوله در پوش دار – لوله پلی پروپیلن
5. برچسب
6. جالوله ای پلاستیکی
7. چسب ضد حساسیت نمونه گیری
8. دستکش لاتکس
9. سیفتی باکس (ظروف ایمن)

- 1- ابتدا باید از هویت فرد مورد آزمایش اطمینان حاصل نمائید.
2. سپس فرد را بر روی صندلی مناسب بنشانید، بیمار دست خود را مشت نموده و بازو بند را 10-7/5 سانتی متر بالای محل نمونه گیری ببندید و پس از ضد عفونی محل با پد الکلی و خشک شدن الکل، نمونه گیری را در وضعیت نشسته انجام دهید (از ورید مدین کوبیتال و سفالیک دست). توجه داشته باشید به محض ورود خون بدخل سرنگ بازو بند را باید باز کنید. همچنین پس از جاری شدن روان خون بدخل سرنگ باید فرد مشت خود را باز کند (حداکثر بمدت یک دقیقه می توان از بازو بند استفاده کرد).
- 3 - 5 میلی لیتر خون وریدی بیمار در لوله درپوش دار جمع آوری گردد. بعد از خون گیری موضع را از نظر بند آمدن خون کنترل نموده و با چسب ضد حساسیت بیوشانید.
4. بدون گذاشتن درپوش، سرسوزن را در ظروف مقاوم (Safety box) دفع نموده و از هرگونه بریدن و یا خم کردن سرسوزن ها خودداری نمائید.
5. نمونه در لوله حاوی ماده ضد انعقاد بلافاصله و به آرامی 5-10 بار مخلوط شده، در صورتی که نمونه در لوله بدون ماده ضد انعقاد ریخته شود، به آرامی و با اتصال به جدار داخلی لوله تخلیه گردد.
6. برچسب حاوی نام ونام خانوادگی و کد شناسایی را بر روی لوله ها نصب و با چسب شیشه ای روی برچسب آنرا فیکس نمائید.
7. سپس لوله ها را در جالوله ای قرار دهید.

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

### موارد رد نمونه

- هرگونه نشت نمونه به بیرون از لوله
- مخلدوش بودن مشخصات برچسب نمونه
- عدم همخوانی مشخصات ذکر شده در فرم با مشخصات برچسب و کد نمونه
- حجم کم نمونه: میزان خون نباید کمتر از 4 سی سی باشد
- جمع آوری نمونه در لوله های نامناسب ( دارای ضد انعقاد هپارین)

### **Real Time PCR**

نمونه خون کامل در لوله درپوش دار حاوی ماده ضد انعقاد ( EDTA ) جمع آوری شده و جهت جداسازی پلاسما، حداکثر تا 6 ساعت بعد از نمونه گیری به مدت 10-15 دقیقه در 1000 تا 1200 g سانتریفیوژ شود (بر اساس بروشور کیت artus HIV virus 1). سپس پلاسما به میکروتیوب عاری از RNAase و DNAase منتقل گردد. نمونه پلاسما حداکثر تا 48 ساعت در دمای 4-8 درجه سانتی گراد قابل نگهداری بوده و برای نگهداری طولانی مدت باید در دمای -70 درجه سانتی گراد قرار گیرد. در صورت عدم جداسازی پلاسما، خون کامل باید در دمای 4-8 درجه سانتی گراد و حداکثر ظرف مدت 6 ساعت منتقل گردد.

**انتقال نمونه:** انتقال پلاسما باید در دمای 30- تا 15- درجه سانتی گراد و حداکثر تا 24 ساعت صورت پذیرد (یخ خشک). انتقال نمونه ها باید در بسته بندی سه لایه ای مطابق با استاندارد های آزمایشگاه مرجع سلامت انجام پذیرد.

- خون کامل به هیچ عنوان نباید فریز گردد. زیرا سبب کاهش حساسیت تست و منفی کاذب نتایج خواهد شد.
- نمونه ها نباید بیش از حداکثر 2 تا 3 بار انجماد و ذوب گردد. دفعات انجماد و ذوب نمونه ها بخصوص پلاسما سبب نتایج منفی کاذب می گردد.
- به هیچ عنوان نباید از هپارین استفاده شود.
- در صورت عدم دسترسی به یخ خشک، پلاسما باید در محفظه سرد (cold Box) و در کنار آیس پک (Ice Pack) در کوتاهترین زمان ممکن انتقال یابد.

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

### CD4 Count

نمونه خون کامل باید در لوله درپوش دار حاوی EDTA جمع آوری شود. شمارش سلولهای CD4 ترجیحا باید در مدت 6 ساعت انجام پذیرد. در غیر اینصورت نمونه را میتوان حداکثر به مدت 24 ساعت در دمای 2-8 درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

**انتقال نمونه:** انتقال نمونه جهت اندازه گیری سلولهای CD4 باید در دمای 2-8 درجه سانتی گراد و در بسته بندی سه لایه ای مطابق با استاندارد های آزمایشگاه مرجع سلامت در مدت 6-8 ساعت انجام پذیرد.

اگر از کیت CD4 Easy Count Kit (Code NO.05-8410) استفاده شود، پس از اضافه کردن No Lyse Buffer بهتر است خوانش CD4 انجام شود، در غیر اینصورت میتوان نمونه عمل آوری شده را در تاریکی در دمای 2 تا 8 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت نگهداری کرد.

در صورتی که از کیت CD4 Easy Count Kit-Dry (Partec Code NO.05-8410-d) استفاده شود پس از اضافه کردن CD4 buffer خوانش CD4 حداکثر طی دو ساعت بایستی انجام شود.

### ELISA

نمونه خون کامل باید در لوله در پیچ دار بدون ماده ضد انعقاد جمع آوری شود. سپس جهت جداسازی سرم، نمونه جمع آوری شده حداکثر تا 2 ساعت بعد از نمونه گیری به مدت 10-15 دقیقه در 1000 تا 1200 g سانتریفیوژ گردد. سپس سرم به لوله در پیچ دار پلاستیکی منتقل شود.

نمونه سرم جمع آوری شده جهت آزمایش الایزا حداکثر به مدت 72 ساعت در دمای 2-8 درجه سانتی گراد قابل نگهداری می باشد. اگر نمونه ها حداکثر تا 72 ساعت مورد آزمایش قرار نگیرند باید در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد نگهداری شوند.

انتقال نمونه: نمونه سرم باید حداکثر تا 24 ساعت و در دمای 4-8 درجه در بسته بندی سه لایه ای مطابق با استاندارد های آزمایشگاه مرجع سلامت انتقال یابد.

### نکات مهم:

-توجه به موارد خاص مندرج در دستورالعمل همراه هر کیت (بروشور).

-دفعات انجماد و ذوب نمونه هارا باید محدود نمود زیرا ممکن است بر روی نتایج آزمایش HIV و آزمایش های تکمیلی بعدی تاثیر بگذارد.

-وجود همولیز، فیبرین و آلودگی میکروبی در نمونه، نیز سبب نتایج نادرست می شود.

-عدم استفاده از ضد انعقاد هپارین در آزمایش های مولکولی.

-خون کامل به هیچ وجه نباید فریز گردد.

- بیلیروبین بالا و لیپمیک بودن سبب ایجاد تداخل در آزمایش های مولکولی خواهد شد. لذا پیش از نمونه گیری از نوزاد، از بالا نبودن بیلیروبین اطمینان حاصل نموده و جهت جلوگیری از لیپمیک شدن پلاسما نیز بهتر است، نمونه گیری حداقل 2 ساعت پس از زمان شیر خوردن نوزاد صورت پذیرد.

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

### انتقال نمونه های عفونی

انتقال نمونه های آلوده یا نمونه هایی که احتمال آلودگی آنها وجود دارد از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، از بخش های مختلف بیمارستان به آزمایشگاه بیمارستان یا آزمایشگاه خارج از بیمارستان و نیز از مطب پزشکان 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 طی انتقال نمونه به نحوی که کیفیت و تمامیت نمونه حفظ شود، صورت پذیرد. حمل و نقل نمونه ها می تواند از راه هوا، دریا، جاده و راه آهن طبق قوانین موجود در هر کشور و دستورالعمل مربوطه، با رعایت شرایط صحیح بسته بندی و انتقال انجام شود.

### **بسته بندی نمونه ها**

بسته بندی کلیه نمونه ها می بایست 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.

### **روش بسته بندی:**

جهت بسته بندی نمونه ها طبق شرایط استاندارد، باید از سه محفظه که واجد شرایط ذیل باشد، استفاده گردد:

-نمونه ابتدا باید داخل یک ظرف درپنج دار که غیرقابل نفوذ به مایعات و همچنین غیر قابل نشت بوده، قرار داده شود. بیشتر اوقات نمونه ها داخل لوله آزمایش حمل می شوند.

در صورتی که تعداد نمونه ها و یا تعداد لوله ها زیاد باشد، برای جلوگیری از تماس بین آنها می توان لوله ها را توسط جداکننده های مقوایی ضخیم و یا جداکننده هایی از جنس دیگر مانند اسفنج از یکدیگر جدا کرده و بسته بندی نمود.

در صورتی که نمونه مایع باشد، باید اطراف لوله ها به طور جداگانه 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 (لوله آزمایش) و محفظه دوم قرار می گیرند تا در صورت شکستن لوله ها یا 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 شکسته شدن یا آسیب به لوله، 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.

-در مرحله بعد محفظه دوم داخل محفظه سوم که مقاوم به ضربه و شرایط محیطی نامساعد بوده، قرار داده می شود. در مورد نمونه هایی که نیاز به رعایت زنجیره سرد دارند محفظه سوم می تواند Cold Box باشد.

نمونه خون، سرم و پلاسما جهت بررسی HIV در گروه B (UN 3373) قرار دارند و مطابق شکل قرار داده شده در این دستورالعمل، بسته بندی می شوند.

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

### علامت گذاری

کلیه بسته ها باید قبل از انتقال بطور مناسب علامت گذاری شده طوری که حاوی اطلاعات لازم در خصوص ماهیت نمونه، خطرات آن و استانداردهای رعایت شده جهت بسته بندی باشد.

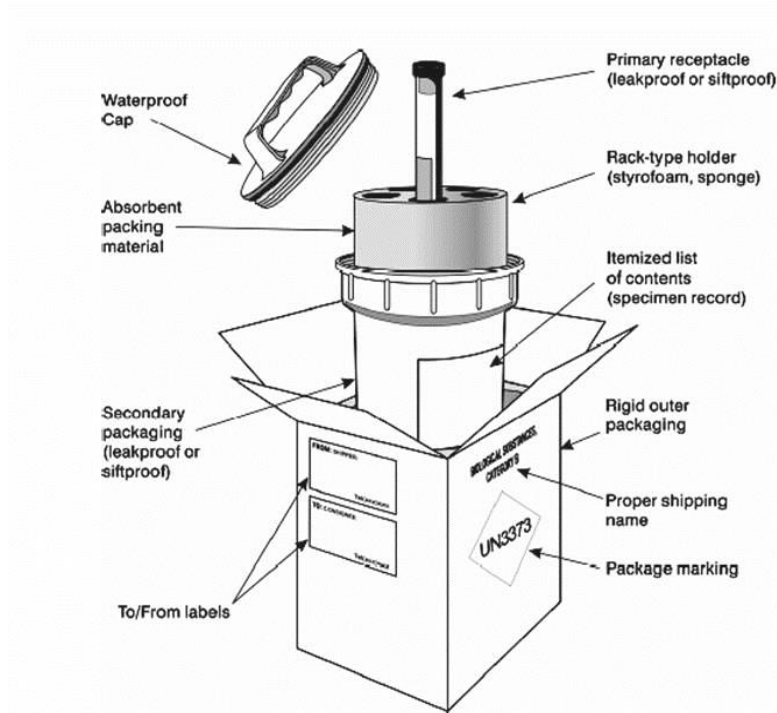
علائم روی بسته ها باید واضح و خوانا باشند و به گونه ای قرار گیرند که کاملاً قابل مشاهده بوده و توسط برچسب یا علامت دیگری پوشانده نشده باشد. روی محفظه خارجی (محفظه سوم) هر بسته باید اطلاعات زیر درج گردد:

- 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 UN
- نام گذاری ویژه برای گروه های خطر (Proper Shipping Name): برای انتقال نمونه هایی که درگروههای خطر مختلف قرار می گیرند نامگذاری ویژه ای وجود دارد که بر روی محفظه بیرونی نمونه درج می گردد
- برای انتقال نمونه های گروه UN3373 B باید عبارت Clinical Specimens و یا Diagnostic Specimens بر روی بسته مربوطه درج شود.
- 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 6" در قسمت پایین آن درج شده باشد.

- ✓ 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 نگه داری و منتقل شده و ارسال کننده از دریافت آن توسط گیرنده مطمئن شود.

## راهنمای جمع آوری، جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه جهت تشخیص آزمایشگاهی HIV

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



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

\* **پلاسمای خون:**

پلاسمای 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 خون:**

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

فرق اصلی سرم با پلاسمای در این است که برخلاف پلاسمای سرم خون فاقد پروتئینهای انعقادی مانند فیبرینوژن است. سایر پروتئینها، آنتی ژنها، آنتی بادیها، آنزیمها و الکترولیتهای خون در سرم موجودند.

DBS: Dried Blood Spot\*