جزوه کارورزی علوم آزمایشگاهی

گروه علوم آزمایشگاهی و هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

بخش بیوشیمی:

تست های بخش بیوشیمی:

1. FBS (Fasting Blood Sugar) اندازه گیری قند خون ناشتا

BS (Blood Sugar) اندازه گیری قند خون بدون ناشتایی

BS 2hPP اندازه گیری قند خون دو ساعت بعد از صبحانه

BS 4 PM اندازه گیری قند خون چهار ساعت بعد از نهار

طبق دستورالعمل کیت: معمولا نمونه سرم می باشد. از پلاسما EDTA دار یا هپارین نیزاستفاده می شود .

روش انجام آزمایش اندازه گیری تک نقطه ای به روش فتومتریک می باشد.

جهت جلوگیری از گلیکولیز، سرم یا پلاسما حداکثر یک ساعت بعد از نمونه گیری سانتریفوژ و جدا شود.

کاربرد تست: تشخیص دیابت، سرطان غده پانکراس، ارزیابی متابولیسم کربوهیدرات

هشدار: معمولا کیت ها حاوی سدیم آزاید برای پایدار کردن محلول می باشند.

گاهی اوقات از ترکیبات فلوراید برای پایداری قند خون در سرم استفاده می شود.

2. Blood Urea/Blood Urea Nitrogen (BUN یا UREA)

اندازه گیری اوره خون

روش : معمولا آنزماتیک می باشد.نمونه سرم یا پلاسمای هپارینه

پایداری نمونه جهت آزمایش اوره: در دمای اتاق تا 24 ساعت- در یخچال یک هفته- در 20- به مدت 2-3 ماه

- اوره متابولیسم اصلی حاصل از کاتابولیسم پروتئین ها می باشد. بیوسنتز اوره از ترکیبات نیتروژن دار، در کبد انجام می شود.
افزایش اوره به دلایل زیر می باشد:
- پره رنال: افزایش تجزیه پروتئین، خونریزی دستگاه گوارش، شوک، برخی بیماری های مزمن کبدی
- رنال و پست رنال: بیماری های مزمن و حاد کلیوی، بیماری های انسدادی که مانع جریان ادرار شود.
- رژیم غذایی پر پروتیئن، از دست دادن آب بدن، تحلیل عضلانی ناشی از سوء تغذیه

نکته: فلوراید جهت جلوگیری از گلیکولیزدر آزمایش اندازه گیری قند ، در روند اندازه گیری اوره اختلال ایجاد می کند.زیرا فلوراید بر روی آنزیم اوره از اثر بازدارندگی دارد.

3. Creatinine یا به اختصار crea

اندازه گیری کراتینین سرم

نمونه سرم ، پلاسمای هپارینه، ادرار 24 ساعته

روش: کلرومتریک، ژافه، کینتیک

اندازه گیری اوره و کراتینین سرم برای ارزیابی عملکرد کلیه کاربرد دارد.

نکته: عواملی مثل رژیم غذایی، از دست رفتن آب، متابولیسم پروتئین ها، اوره را افزایش می دهند ولی روی کراتینین اثری ندارند، بنابراین ارزش تشخیصی کراتینین بیشتر از اوره می باشد.

- از آنجایی که میزان کراتینین سرم ثابت است، افزایش کراتینین همراه با افزایش اوره نشان دهنده کاهش فیلتراسیون گلومرولی می باشد.
- نکروز عضله، میزان کراتینین را افزایش می دهد.
- چنانچه درپیوند کلیه ، کراتینین سرم افزایش یابد نشان دهنده رد پیوند می باشد.
- کلیرانس کراتینین شاخص خوبی برای فیلتراسیون گلومرولی کلیه می باشد.

4. Cholesterol

اندازه گیری کلسترول خون

نمونه سرم یا پلاسمای EDTA دار یا هپارینه

روش اندازه گیری: آنزیمی- اندازه گیری تک نقطه ای با روش فتومتریک

5. HDL : برداشت کلسترول از بافت ها

6. LDL : انتقال کلسترول به داخل بافت

نمونه معمولا سرم می باشد.

کلسترول در سلول ها سنتز می شود و از طریق غذایی نیز جذب می گردد.

حمل کلسترول در پلاسما توسط لیپوپروتئین ها می باشد. کلسترول یکی از اجزاء اصلی ساختمان غشاهای سلولی ، پیش ساز هورمون های استروئیدی و اسید های صفراوی می باشد. رابطه نزدیکی بین LDL و بیماری های کرونری قلب و آرترواسکلروز می باشد.

- در صورتی که کلسترول نرمال باشد ولی LDL بالا باشد و یا HDL پایین باشد، نشانگر بالا بودن خطر ابتلا به بیماری های قلبی عروقی و آرترواسکلروز می باشد.
- HDL نقش حفاظت و پیشگیری در برابر این بیماری ها را با برداشت کلسترول از بافت ها انجام می دهد.

7. Triglyceride یا به اختصار TG

اندازه گیری تری گلیسرید خون

روش : آنزیمی – اندازه گیری تک نقطه ای با روش فتومتریک

نمونه سرم یا پلاسمای EDTA دار یا هپارینه

تری گلیسرید ها، ترکیبات استری از گلیسرول و اسید چرب هستند که در تشخیص و پیگیری اختلالات مربوط به لیپوپروتئین ها اهمیت زیادی دارند. در پلاسما در اتصال با آپولیپوپروتئین ها به شکل VLDL و شیلومیکرون ها حمل می شوند. اندازه گیری آن ها در پیش بینی خطر ابتلا به بیماری آرترواسکلروز، کنترل سطح چربی خون، بررسی درمان و عملکرد دارو های کاهش دهنده سطح چربی ها حائز اهمیت است. افزایش سطح TG همراه با افزایش LDL در پلاسما، با افزایش خطر ابتلا به بیماری های کرونری قلبی رابطه مستقیم دارد. همچنین بالا بودن سطح تری گلیسرید در بیماری های مختلف کبدی، کلیوی، پانکراتیک نیز دیده می شود.

Uric Acid .8

اندازه گیری اسید اوریک خون

روش : آنزیمی

نمونه سرم، پلاسماحاوی EDTA یا هپارین

اسید اوریک و نمک های آن، محصول نهایی متابولیسم پورین ها هستند. مهمترین بیماری که در افزایش اسید اوریک ایجاد می شود نقرس است.در نقرس کریستال های اسید اوریک اطراف مفاصل تشکیل می گردد.

9. SGOT یاAST سرم گلوتامیک- اگزالواستیک ترانسفراز (آسپارتات ترانسفراز)

10. SGPTیا ALT سرم گلوتامیک -پیرورویک ترانسفراز (آلانین ترانسفراز)

AST وALT انزیم های ترانس آمیناز هستند که واحدهای آمین رابه آلفا کتواسید انتقال می دهند و اسید آمینه تشکیل می گردد.

- ALT به عنوان آنزیم اختصاصی کبد اختصاصی بیماری های کبدی می باشد.
- افزایش سطح AST در آسیب های پارانشیم کبدی وهمچنین در صدمات قلبی یا عصلانی مشاهده می گردد.
- نسبت $\frac{AST}{ALT}$ در تشخیص افتراقی بیماری های کبدی استفاده می شود.
- نسبت $\frac{AST}{ALT}$ کمتر از یک نشان دهنده آسیب خفیف کبدی و نسبت $\frac{AST}{ALT}$ بیشتراز یک نشان دهنده آسیب شدید یا بیماری مزمن کبدی می باشد.

هشدار: کیت حاوی سدیم آزاید برای پایداری کیت می باشد.

ALK .11

اندازه گیری آلکالن فسفاتاز سرم

روش فتومتریک.نمونه سرم

این آنزیم در کبد و استخوان فراوان است اما در کلیه ، جفت، ریه، بیضه، تیموس نیز یافت می شود.

- افزایش به طور فیزیولوژیک در بچه های در حال رشد، در دوران بارداری
- افزایش به طور پاتولوژیک در انسدادمجاری صفراوی (کلستاز)، یرقان های انسدادی، عفونت های هپاتیتی، بیماری های استخوانی، بیماری پاژه، راشیتیسم، استئومالسی، هیپرپاراتیروئید

Bil.Direct .12

اندازه گیری بیلی روبین مستقیم

روش فتومتریک با استفاده از 2 و 4 دی کلروآنیلین

یکی از محصولات تجزیه Hb، بیلی روبین است. بیلی روبین غیرکونژوگه آزاد، غیرقطبی، نامحلول در آب است. بنابراین برای انتقال ، با آلبومین تشکیل کمپلکس می دهد.بیلی روبین در کبد به اسید گلوکورنیک متصل شده و به بیلی روبین- گلوکورونیک اسید تبدیل می شود و به صورت محلول در آب از طریق مجای صفراوی دفع می گردد.

افزایش Bil در موارد زیر دیده می شود

- افزایش تولید آن در اثر همولیز(یرقان پیش کبدی)
- آسیب پارانشیم کبدی (یرقان میان کبدی)
- انسداد مجاری صفراوی(یرقان پس کبدی)

Bil.total .13

اندازه گیری بیلی روبین توتال

روش اندازه گیری مانند بالامی باشد.

Calcium–14 یا به اختصار Ca

اندازه گیری کلسیم

کلسیم نقش مهمی در بسیاری از فعالیت های سلولی دارد.

کلسیم به سه شکل در خون وجود دارد:

1- کلسیم آزاد2- کلسیم متصل به پروتئین3- کلسیم متصل به آنیون ها مثل فسفات، سیترات، بی کربنات

- کاهش غلظت کلسیم توتال در بیماری های استخوانی(پوکی استخوان)- بیماری های کلیوی (دیالیز)- هیپوپاراتیروئید-اختلالات جذب روده ای
- افزایش غلظت کلسیم توتال در هیپرپاراتیروئیدیسم، تومورهای بدخیم، سارکوئیدوزیس

Phosphorus–15 یا به اختصار Ph

فسفر در بدن تنها فقط به شکل فسفات دیده می شود. فسفر در پلاسما به شکل فسفات کلسیم است بنابراین سطح فسفر پلاسما وابسته به میزان کلسیم است.

کاربرد اندازه گیری فسفر در سرم و ادرار، در تشخیص اختلالات کلیوی، استخوانی، غده پاراتیروئید است.

افزایش فسفر در آسیب های کلیوی، هیپو پاراتیروئیدیسم

کاهش فسفر در سوء جذب، هیپر پاراتیروئیدیسم، کمبود ویتامین دی

Magnesium–16 یا به اختصار Mg

اندازه گیری منیزیم. نمونه سرم، پلاسما، ادرار

منیزیم یکی از کاتیون های اصلی داخل سلولی بدن است.

- کاهش منیزیم سبب اختلالات عصبی، عضلانی، ضعف، لرزش، تتانی؛ تشنج می شود کاهش منیزیم در هیپوکلسمیا، دیابت، الکلیسم، دیالیز، بارداری دیده می شود
- افزایش منیزیم در دهیدراتاسیون، بیماری آدیسون، نقص در عملکرد کلیه

Amylase -17 یا به اختصار Amy

اندازه گیری آمیلاز

– نمونه سرم، پلاسما، ادرار

امیلاز پانکراس: در پانکراس تولید شده و در مجرای روده آزاد می شود.

آمیلاز بزاق: در غدد بزاقی تولید میشود.

افزایش آمیلاز در پانکراتیک حاد مشاهده می شود. از آنجایی که در بیماری های اوریون (وجود آمیلاز بزاقی) و نارسایی کلیه (عدم دفع آمیلاز از ادرار) میزان آمیلاز سرم بالا می باشد، جهت تشخیص پانکراتیک حاد لازم است تست لیپاز نیز اندازه گیری شود.

Lipase .18

اندازه گیری لیپاز

- نمونه سرم

- روش اندازه گیری آنزیمی

لیپاز در پی آسیب های حاد پانکراس بالا می رود، غلظت آن در مدت 4 تا 8 ساعت افزایش یافته و طی 24 ساعت به اوج می رسد.

افزایش لیپاز همچنین در کوله سیستیت، پانکراتیت مزمن، کارسینوما پانکراس، گرفتگی مجاری پانکراس مشاهده می گردد.

Serum Total Protein–19 یا به اختصار T.P

اندازه گیری پروتئین توتال

– نمونه سرم و پلاسمای هپارینه

- روش اندازه گیری معمولا بیوره

افزایش حجم پلاسما(در سندرم احتباس نمک و مسمومیت با آب) سبب هیپو پروتئینمیا می گردد.

کاهش حجم پلاسما (در دهیدراتاسیون ناشی از استفراغ و اسهال) سبب هیپرپروتئینمیا می گردد.

چنانچه حجم پلاسما طبیعی باشد میزان غیرطبیعی بودن پروتئین، ناشی از اختلالاتی مانند سوء جذب، سوء هاضمه، بیماری های کبدی و کلیوی می باشد که موجب کاهش توتال پروتئین می گردد.

Serum Albumin-20یا به اختصار Alb

اندازه گیری آلبومین

-نمونه سرم

روش اندازه گیری : تشکلی کمپلکس رنگی با برم کروزول گرین

نقش اصلی آلبومین حفظ فشار اسمزی در فضای داخل و خارج عروقی است.

افزایش آلبومین: در دهیدراتاسیون حاد به خصوص در نوزادان اهمیت دارد.

کاهش آلبومین: در موارد پاتولوژیک بسیاری از بیماری های دیده می شود.مانند

- التهاب حاد و مزمن
- کاهش ساخت آلبومین در عفونت های کبدی و سوء تغذیه
- افزایش دفع آلبومین در سندرم نفروتیک، دفع گوارشی، سوختگی های وسیع
- افزایش کاتابولیسم در تب و هیپرتیروئیدیسم

Serum Potassium-21 یا K

اندازه گیری پتاسیم

نمونه سرم

کاهش پتاسیم در موارد زیر مشاهده می شود

- دفع گوارشی پتاسیم(اسهال، استفراغ، تومور معده، سوء جذب، شیمی درمانی)
- دفع کلیوی پتاسیم(سندرم کوشینگ، لوکمی حاد، افزایش ترشح آلدسترون،...)
- شیفت سلولی(آلکالوز، دریافت دوز بالای انسولین)
- کاهش دریافت پتاسیم

افزایش پتاسیم در موارد زیر مشاهده می شود

- کاهش دفع کلیوی(کاهش آلدسترون، نارسایی کلیه،...)
- شیفت سلولی (اسیدوز، شیمی درمانی، لوکمی، کم خونی همولیتیک،...)
- افزایش دریافت(درمان جایگزینی پتاسیم از طریق خوراکی یا IV)
- افزایش کاذب(همولیز نمونه، بستن طولانی مدت تورنیکه)

Serum Sodium-22 یا NA

اندازه گیری سدیم خون(نمونه سرم- دستگاه الکترولیت آنالیزر)

هایپرناترمی به معنی بالا بودن غلظت های سدیم خون است.نشانه های آن تشنگی، خستگی، ورم کردن دست ها و پاها، ضعف بدنی، فراموشی، تپش قلب

دلایل بروز هیپرناترمی: دهیدراتاسیون، اسهال، کاهش هورمون وازوپرسین، هیپرآلدسترونمی،سندرم کوشینگ،مصرف برخی داروها مثل داروهای مسکن، لیتیم، کورتیکواستروئیدها،قرص های ضد بارداری

کاهش سدیم خون یا هیپوناترمی

- داروهای ضد افسردگی، داروهای ضد درد
- سوختگی های وسیع روی پوست
- بیماری کلیوی
- بیماری کبدی یا سیروز
- اسهال یا تهوع شدید
- ایست قلبی
- بالا بودن برخی هورمون ها، برای مثال هورمون ضد ادرار یا وازوپرسین
- کتون های موجود در خون، که با اسم کتونوریا شناخته می شوند.
- هیپوتیروئیدیسم
- بیماری آدیسون که طی آن هورمون های کمی در غده فوق کلیوی تولید می شوند.

LDH -23

اندازه گیری لاکتات دهیدرژناز

نمونه سرم

افزایش پاتولوژیک LDH: در بیماری های قلبی ،بیماری های خونی، ماهیچه ای

نتایج LDH در کنارAST و ALT و ALK ارزش دارد.

این آنزیم 5 ایزوآنزیم دارد و عمل آن تسریع واکنش های تبدیل L-لاکتات و پیروات می باشد.

CK-24

اندازه گیری کراتین کیناز

نمونه سرم

آنزیم شامل ایزوانزیم های CK-MM و CK-MB و CK-BB می باشد.

افزایش فعالیت آنزیم در آسیب ماهیچه های قلبی و بیماری های ماهیچه اسکلتی می باشد.

CK-MB-25

اندازه گیری CK-MB در کنار اندازه گیری CK یک تست کاملا اختصاصی برای تشخیص آسیب ماهیچه قلب و بررسی حمله قلبی می باشد.

GGT-26

اندازه گیری گاما گلوتامیل ترانسفراز

در بیماری انسداد مجاری صفراوی اندازه گیری این تست حائز اهمیت است.

اتوآنالایزر بیوشیمی چیست؟

دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمی ابزاری است که از سرم خون یا نمونه ادرار، برای اندازه‌گیری اجزای مختلف مانند قند، کلسترول، پروتئین، آنزیم‌ها و غیره استفاده می‌کند، مورد استفاده مراکز درمانی و بهداشتی یا بیمارستان‌ها قرار می‌گیرد تا با بررسی‌های مبتنی بر نتایج داده‌های عینی، موجب تشخیص زودهنگام بیماریها و به تبع آن، بهبود فرایند درمان و حتی پیش آگهی از بعضی بیماری‌ها می‌گردد. علاوه بر این، با توجه به افزایش هزینه‌های پزشکی، انتظار می رود که تجهیزات پزشکی جدید، به لحاظ اقتصادی نیر کارآمدتر از گذشته طراحی گردند. این دستگاه‌ها با استفاده از حجم بسیار کم نمونه و مواد واکنش دهنده و همچنین با سرعت بسیار بالا و پردازش فوق دقیق که ویژگی منحصر به فرد آنهاست انواع ترکیبات داخل خون را آنالیز و اندازه گیری می‌نمایند.

اساس کار اتوآنالایزر

اتوآنالایزر، ابزاری برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی است و می‌تواند بیش از ۱۰۰ نوع از ترکیبات داخل خون را اندازه‌گیری نماید. اصل کلی که اندازه‌گیری مذکور بر آن استوار است به زبان ساده شبیه به آزمایش ید-نشاسته ای است که از زمان کلاس‌های علوم مدرسه به یاد درید. اگر خاطرتان باشد، زمانی که شما محلول ید را به محلول نشاسته اضافه می‌کردید محلول فورا به رنگ آبی تغییر رنگ می‌داد و وجود نشاسته تایید می شد. بعلاوه، شاید یادتان مانده باشد که اگر بزاق دهان، به این محلول اضافه شود، رنگ آبی آن، ناپدید خواهد شد که این خود به دلیل وجود آنزیمی به نام آمیلاز در بزاق دهان است که باعث حل شدن نشاسته می‌گردد. اتوآنالایزرهای بیوشیمی نیز، از این نوع واکنش بهره می‌برند و مقداری از یک ماده ویژه در خون را به همان مقدار رنگ، برای اندازه‌گیری تبدیل می‌کنند. این روش کالریمتریک با رنگ‌سنجی نام دارد روشی کاملا قدیمی که سایه‌ای از رنگ‌ها تولید می‌شوند که با چشم غیر مسلح هم دیده می‌شود. اساس ارزیابی در واقع همان است که در زمان کیمیاگری باستان کاربرد داشته است اما اتوآنالیزرهای بیوشیمی جدید، با نوآوری و فناوری، همان فرآیند اندازه‌گیری و انجام کار را به جای روش دستی و اسپکتروفتومتر ، به شکل تمام اتوماتیک و بدون دخالت دست انجام می دهند.

دستورالعمل فنی اتوانالایزر

نمونه‌های لازم برای کار کردن با دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمی، در واقع همان قسمت مایع زرد رنگ بالای خون سانتریفیوژ شده است که سرم نام دارد و همچنین میتوان از ادرار هم استفاده کرد. یک حجم دقیق از نمونه (به طور معمول ۳۰ میکرولیتر) با استفاده از یک پیپت (پروب سمپل) جمع آوری می‌شود و با آب مقطر رقیق می‌گردد. از این نمونه رقیق شده، یک مقدار دقیق از ۲ تا ۲۵ میکرولیتر برای هر مورد تست برداشت شده و به یک سلول واکنش (کووت) منتقل می‌شود. این سلول واکنش حاوی ریجنتی (معرف) است که قبلا از بطری معرف توسط پروب ریجنت برداشت شده و به سلول واکنش اضافه شده است. دما در این سلول واکنش ۳۷درجه سانتی گراد است اگر یک واکنش رنگی رخ ندهد، ممکن است معرف دوم یا سوم اضافه شود. پس از اجازه دادن به واکنش برای یک زمان معین (به طور معمول ۱۰ دقیقه)، تراکم رنگ با استفاده از یک رنگ سنج (چند سنجش چند طول موج) اندازه‌گیری می‌شود. مکانیسم رنگ سنجی این است که یک نور را از کووت واکنش عبور کرده و سپس مقدار طول موج خروجی اندازه گیری شده و داده‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از مبدل های A / D (مبدل آنالوگ ⟶ دیجیتال)، توسط CPU محاسبه می‌شوند و نتایج استخراج می شود.

انواع اتوآنالایزر بیوشیمی

اتوآنالایزرها بر اساس برنامه نرم افزاری شرکت سازنده و به لحاظ نوع مواد مصرفی به دو دسته کلی تقسیم می شوند:

open system .1

مزیت این نوع سیستم ها بیشتر در دادن این امکان به آزمایشگاه است که از هر نوع کیت و از هر شرکت تولید کننده با توجه به توان مالی خرید نماید. زیرا اپراتور دستگاه می تواند پارامترهای مربوط به هر کیت را بر اساس کیت خریداری شده تغییر دهد در این حالت آزمایشگاه می تواند کیت های ارزانتری خریداری نماید و هیچ محدودیتی در خرید انواع کیت مصرفی نخواهد داشت. بدین ترتیب آزمایشگاه قادر است با توجه به شرایط اقتصادی تصمیم به خرید نماید و هزینه های هر تست را کاهش دهد.

همچنین در اتوآنالایزرهای ماژولار، این امکان جالب وجود دارد تا برخی از قسمت ها جابجا گردد. در واقع این دستگاهها حالت یکپارچه یا integratedنداشته و از چیدمان قسمتهای مختلف در کنار یگدیگر درست شده اند به عنوان مثال می توان قسمت Ion selective electrodeرا که تست های سدیم،پتاسیم و کلر را انجام می دهد، بعدا به دستگاه اضافه نمود.

closed system .2

اما در این نوع سیستم ها، آزمایشگاه مجبور است تا مواد مصرفی و کیتهای آن را از همان شرکت سازنده دستگاه خریداری نماید و سایر کیتها که توسط دیگر شرکتها تولید شده، برای دستگاه مذکور قابل قبول نمی‌باشد و دستگاه قادر به کار با سایر کیتها نخواهد بود. بنابراین آزمایشگاه، در صورت افزایش هزینه تهیه مواد مصرفی از برند اصلی، قادر به کاهش هزینه های خود نخواهد بود. همچنین از آنجا که ریجنت ها و مواد مصرفی در ظروف مخصوص و ویژه ای با یک فرمت و قالب خاص تهیه گردیده اند، بنابراین این هزینه ها به قیمت هر تست نیز اضافه می کند. البته قابل کتمان نیست که اغلب سیستم های بسته، درجه بالاتری از کیفیت را ارائه می دهند.

سیستم های CLOSE به دو دسته اصلی تقسیم می شوند:

1. Modular system سیستم های ماژولار
2. Integrated system سیستم های یکپارچه

انواع اتوآنالایزر بیوشیمی از لحاظ نوع خوانش:

در این اتوآنالایزر قرائت به صورت تست به تست انجام شده و نتایج نیز به همین صورت نشان داده میشود. سرعت قرائت تست ها در این نوع آنالایزرها بین ۴۰ الی ۸۰ تست در ساعت است.

در این اتوآنالایزرها قرائت در حالت عادی به صورت تست به تست انجام می شود، ولی امکان تعریف اجرای چند تست مختلف برای یک نمونه و به صورت متوالی نیز وجود دارد که در این صورت باید از قسمت اورژانس یا برنامه Stat دستگاه استفاده کرد. همچنین در این اتوآنالایزرها دستیابی به نتایج به هردو صورت یعنی تست به تست یا بیمار به بیمار امکان پذیر است. سرعت این اتوآنالایزرها معمولا بین ۸۰ الی ۲۴۰ تست در ساعت است.

در این اتوآنالایزرها می توان در هر زمان و برای نمونه، تست مورد نظر را انتخاب و اجرا کرد. حال آنکه رعایت هیچ گونه ترتیبی اجباری نیست. سرعت این اتوآنالایزرها بین ۱۰۰ الی ۶۰۰ تست در ساعت است.

بخش هورمون:

تست های بخش هورمون شناسی:

معمولا با روش الایزا Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) انجام می شود.

BHCG–1

HCG هورمون گلیکوپروتئینی است که به صورت نرمال در دوران بارداری توسط جفت ترشح می شود. با شروع بارداری غلظت آن در خون به سرعت افزایش یافته و در اواخر سه ماهه اول به بالاترین میزان خود می رسد. از نظر ساختمانی ملکول HCG دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد، زنجیره آلفا، ساختمان مشابهی با زنجیره آلفای سایر هورمون های گلیکوپروتئینی مانند FSH، LH و TSHدارد. برخی آنتی بادی ها توانایی شناسایی اپی توپ خاصی از زنجیره بتا را در ملکول HCG دارند که این اپی توپ ها در سایر هورمون های پروتئینی وجود ندارد.بنابراین با استفاده از این آنتی بادی ها می توان سنجش این هورمون را به صورت اختصاصی انجام داد.روش های اختصاصی امکان تشخیص بارداری را 8 تا 11 روز بعد از لقاح فراهم می سازد.

اساس آزمایش : اساس کیت معمولا به روش ساندویچ و با استفاده از انتی بادی مونوکلونال می باشد. در این روش چاهک ها توسط انتی بادیی علیه یک شاخص آنتی ژنیک ملکول HCG پوشش داده می شوند(Coating). نمونه بیمار با انتی بادی پوشش داده شده در ته چاهک ها مجاور می شود، پس از انکوباسیون و شستشو، انتی بادی ثانویه ضد HCG متصل به انزیم HRP به چاهک ها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها با غلظت HCG در نمونه ها متناسب است. پس از شستشوی مرحله دوم، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید و کروموژن است، داخل چاهک ها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده می باشد.با افزودن محلول متوقف کننده(ویال حاوی اسید کلریدریک) رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

2- PRL (Prolactin)

پرولاکتین هورمون پلی پپتیدی است که از بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح پرولاکتین توسط فاکتورهای آزاد کننده و مهار کننده که از هیپوتالامس ترشح می شوند تنظیم می گردد. در دوران بارداری و پس از تولد نوزاد غلظت پرولاکتین افزایش می یابد، استرس های روحی، فیزیکی و هیپوگلیسمی نیز می توانند باعث افزایش پرولاکتین گردند. در خانمها افزایش پرولاکتین می تواند باعث ایجاد اختلال در عادت ماهانه گردد و در آقایان باعث تضعیف قدرت جنسی شود.از نظر پاتولوژیک برخی عوارض هیپرپرولاکتینمیا عبارتند از انواعی از میکرو آدنوم ها و ماکروآدنوم ها، هیپوتیروئیدیسم و اختلالات کلیوی

اساس آزمایش :معمولا روش الایزای ساندویچ و استفاده از انتی بادی منوکلونال

T_3-3

همانند T_4 در غده تیروئید ساخته می شود.البته فقط 20٪از T_3 موجود در خون در تیروئید ساخته می شود و 80٪ دیگر از تجزیهT_4 در بافت ها ساخته می شود. قابل ذکر است مقدار آزاد این هورمون در خون بسیار کم حدود 0.3٪ بوده که می تواند به ئاخل بافت ها وارد شده و اثر خود را اعمال کند وبقیه این هورمون به صورت متصل با پروتئین ها است که اصلی ترین این پروتئین ها ، تیروکسین بایندیگ گلوبولین (TBG) و آلبومین می باشند، T_3 در سوخت و ساز سلولی بسیار موثر بوده و در رشد بدن و همچنین رشد و تمایز اعضاء جنسی نقش اساسی دارد.اندازه گیری$Total\ T_3$ فاکتور مهمی در بررسی اختلالات تیروئید بخصوص در هیپرتیروئیدیسم به شمار می رود.

اساس آزمایش: کیت T_3 معمولا به روش الایزای رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است.

T_4-4

هورمون تیروکسین T_4 در غده تیروئید از ید و تیروزین ساخته می شود.فقط 0.02 تا 0.03 درصد از این هورمون در خون به صورت آزاد وجود دارد وبقیه این هورمون به صورت متصل به پروتئین ها است که اصلی ترین این پروتئین ها، تیروکسین بایندینگ گلوبولین(TBG) می باشد، مقدار کل تیروکسین در خون (Total T_4) به عنوان یک فاکتور مهم در بررسی وضعیت تیروئید می باشد.به طور معمول در هیپرتیروئیدیسم مقدار T_4 افزایش می یابد و در افراد هیپوتیروئیدیسم مقدار آن کاهش می یابد.

اساس آزمایش: : کیت T_4 معمولا به روش الایزای رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است.

TSH-5

هورمون محرک غده تیروئید (تیروتروپین) نوعی گلیکوپروتئین می باشد که از غده هیپوفیز ترشح می شود. این هورمون دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد، زنجیره آلفا، ساختمان مشابهی با زنجیره آلفای سایر هورمون های گلیکوپروتئینی مانند FSH، LH و HCG دارد.زنجیره بتا مسئول خاصیت ایمونولوژیکی و بیولوژیکی این هورمون می باشد.سنتز و آزادسازی TSH از طریق غلظت هورمون های تیروئیدی T_3 وT_4 ، توسط هورمون آزلد کننده تیروتروپین (TRH) هیپوتالاموس کنترل می شود. هورمون های تیروئیدی، ترشح TSH را با مکانیسم فیدبک منفی تنظیم می کنند. به عبارت دیگر، افزایش غیرطبیعی غلظت T_3 وT_4 باعث کاهش ترشح TSH می شود، کاهش غلظت T_3 وT_4 باعث افزایش ترشح TSH می شود. افزایش غلظت سرمی TSH اولین و بهترین نشانگر کم کاری اولیه تیروئید می باشد و برای ارزیابی عملکرد محور هیپوفیز- هیپوتالاموس به کار می رود.

افزایش میزان TSH

- هیپوتیروئیدی اولیه
- تیروئیدیت
- کرتینیسم مادرزادی
- دوز های بالای ید
- تزریق ید رادیواکتیو
- برداشت تیروئید با عمل جراحی
- بیماری های شدید و مزمن

کاهش میزان TSH

- هیپوتیروئیدی ثانویه
- هیپرتیروئیدی
- دوز های سرکوبگر داروهای تیروئیدی
- هیپرتیروئیدی مصنوعی (مصرف خودسرانه داروی تیروئیدی موجب مهار تولیدTSH می شوند)
- گواتر سمی
- بیماری گریوز

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ و استفاده از انتی بادی منوکلونال می باشد.

$25-Hydroxy\ vitamin-D$ .6

این تست جهت اندازه گیری ویتامین دی است. ویتامین دی در کبد هیدروکسیله شده و به شکل فعال آن تبدیل می شود.مشتق $25-Hydroxy\ vitamin-D$ شکل عمده ذخیره ویتامین دی در بدن می باشد وتعیین غلظت آن در سرم ، نشانگر سطح ویتامین دی بدن می باشد.

اساس آزمایش: : کیت معمولا به روش الایزای رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است.

7-فریتین (Ferritin)

فریتین با وزن ملکولی 450 کیلودالتون پروتئین اصلی ذخیره کننده آهن در درون سلول می اشد.علاوه بر ذخیره آهن، فریتین در عملکرد سیستم اینی، واکنش های التهابی، انتقال سیگنال سلولی نقش دارد.افزایش فریتین در موارد زیر مشاهده می گردد: مصرف الکل، التهاب حاد و مزمن، تخریب سلولی، برخی از بدخیمی ها

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ و استفاده از انتی بادی منوکلونال می باشد.

8-FSH

هورمون محرک فولیکولی (FSH) نوعی گلیکوپروتئین می باشد که از غده هیپوفیز قدامی و از سلول های گنادوتروپ ترشح می شود. این هورمون دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد، زنجیره آلفا، ساختمان مشابهی با زنجیره آلفای سایر هورمون های گلیکوپروتئینی مانند TSH، LH و HCG دارد.زنجیره بتا مسئول خاصیت ایمونولوژیکی و بیولوژیکی این هورمون می باشد.این هورمون تحریک کننده بلوغ فولیکول های تخمدان در زنان است. همچنین در مردان ، برای تولید اسپرم ضروری است.

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ و استفاده از انتی بادی منوکلونال می باشد.

9-LH

هورمون محرک LHنوعی گلیکوپروتئین می باشد که از غده هیپوفیز قدامی و از سلول های گنادوتروپ ترشح می شود. این هورمون دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد، زنجیره آلفا، ساختمان مشابهی با زنجیره آلفای سایر هورمون های گلیکوپروتئینی مانند TSH، FSH و HCGدارد. زنجیره بتا مسئول خاصیت ایمونولوژیکی و بیولوژیکی این هورمون می باشد. در هر دوجنس مرد و زن، LH ترشح استروئیدهای جنسی از غدد جنسی را تحریک می کند.LH به رسپتورهای روی سلول های لیدیک متصل شده وباعث سنتز و ترشح تستوسترون در بیضه میگردد همچنین سبب ترشح استروژن در تخمدان ها می گردد.

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ و استفاده از انتی بادی منوکلونال می باشد.

10- HBS. Ag (آنتی ژن سطحی هپاتیت B)

ویروس هپاتیت B ویروس پوشش دار ، DNA دورشته ای، متعلق به خانواده هپادوناویریده می باشد. به همراه هپاتیت Cعامل اصلی هپاتیت در خون می باشد و طیفی از تظاهرات بالینی ایجاد می کند(ازتظاهرات بالینی ملایم تا هپاتیت برق آسا، سیروز وکارسینوم کبدی)

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ

11-HBS. Ab (آنتی بادی هپاتیت B)

در بین آنتی ژن های سطحی ویروس هپاتیت B، شاخص a (اسیدامینه 124-147)هدف مهم در پاسخ ایمنی هومورال است. اندازه گیری آنتی بادی علیه این انتی ژن به عنوان شاخص مصونیت مورد استفاده قرار می گیرد. وجود آنتی بادی دلیل روبروشدن قبلی با عفونت، بهبودی و یا ایجاد ایمنی علیه هپاتیت B به وسیله واکسیناسیون می باشد.

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ

12 Anti-HCV(آنتی بادی هپاتیت C)

ویروس هپاتیت C یک ویروس پوشش دار،RNA تک رشته ای،متعلق به خانواده Flaviviridae

امروزه هپاتیت C علت اصلی هپاتیت های non-B و non-A می باشد.

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ

13- Anti-HIV

شناسایی آنتی بادی علیه ویروسHIV

اساس آزمایش:معمولا روش الایزای ساندویچ

14-GH (هورمون رشد)

اثرات مریوط به رشد این هورمون از طریق IGF-1 یا سوماتومدین C و اثرات متابولیک آن توسط خود هورمون اعمال می شود.

عملکرد هورمون رشد

- افزایش سنتز پروتئین(افزایش ورود اسیدآمینه ها به عضله)
- افزایش گلوکز خون(تحریک گلوکونئوژنز وکاهش مصرف گلوکز توسط سلولها)
- افزایش اسیدهای چرب آزاد پلاسما (تحریک لیپولیز)

در حال حاضر بهترین روش تشخیص بیماران دچار کمبود GH یک آزمایش تحریکی GH می باشد. در آزمایشگاه از کلونیدین برای بررسی ترشح هورمون رشد استفاده می گردد. این ماده با تحریک هیپوفیز (از طریق تحریک GHRH موجب افزایش ترشح هورمون رشد می شود. کلونیدین بعد از جذب معدی از طریق جریان خون به مغز رسیده و اثر تحریکی خود را طی ۶۰- ۳۰ دقیقه شروع نموده و بعد از ۴-۲ ساعت به حداکثر میزان اثر خود می رسد .

15- d-dimer یا D-dimer

محصول حاصل از تخریب فیبرین یا FDP است. D-dimers به‌طور معمول در پلاسمای خون انسان وجود ندارد، به جز زمانی که سیستم انعقادی فعال شده‌است، به عنوان مثال به علت وجود ترومبوز یا انعقاد داخل عروقی منتشر شده افزایش می یابد. در آمبولی ریه نیز افزایش D-dimer دیده می شود.

16-هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH)

هورمون ACTH از هیپوفیز پیشین ترشح می شود و موجب افزایش ترشح کورتیزول و آلدوسترون از بخش قشری غده ی فوق کلیوی می گردد.

CORTISOL -17

کورتیزول گلوکوکورتیکوئید مهمی است که نقش اصلی در متابولیسم گلوکز و پاسخ بدن به استرس دارد. کورتیزول هورمونی است که عملکرد غدد هیپوتالاموس، هیپوفیز و فوق کلیه را هماهنگ می کند.
کاهش میزان کورتیزول موجب ترشح هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH) از هیپوتالاموس و CRH باعث افزایش ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) از هیپوفیز می‌شود. ترشح این هورمون پلی پپتیدی موجب افزایش میزان کورتیزول می شود.
افزایش کورتیزول به عنوان پس نورد منفی عمل نموده و موجب کاهش CRH و ACTH می شود. ترشح هورمونACTH همانند کورتیزول درشبانه روز حالت نوسانی دارد، بطوری که در ساعات اولیه صبح (۸-۶ صبح) بیشترین میزان و در حدود نیمه شب (۱۱ شب) کمترین میزان خود را دارا می باشد. سنجش میزان ACTH در بررسی افزایش یا کاهش کورتیزول خون و ارزیابی اختلال هورمونی ناشی از اختلال در عملکرد غدد آدرنال یا هیپوفیز کمک کننده می باشد.

- بهتر است نمونه گیری صبح (۸ صبح پس از خواب راحت شبانه) انجام شود.
- به طور معمول این تغییرات روزانه در بیماری های هیپوفیز یا آدرنال (به ویژه نئوپلاسم) مختل می شود. همچنین استرس نیز سطح این هورمون افزایش می دهد.

بخش هماتولوژی:

تست های این بخش شامل سه زیر مجموعه می باشد:

1. **تست های انعقادی** PT وPTT **و لوپوس و فیبرینوژن.**
2. **CBC** و تست های متفرقه که روی نمونه **CBC** انجام می شود مانند **Retic** و **G6PD** و کومبس مستقیم و گروه خون
3. **ESR**

توجه داشته باشید درخواست پزشک جهت تهیه گسترش PBS می باشد. تهیه و رنگ آمیزی گسترش های خونی که بخش مهمی در ارزیابی خون است.

قطره ی خون را در یک سانتی متری انتهای یک لام تمیز و بدون گرو وغبار که روی سطح صافی جای گرفته است قرار میدهیم سپس با انگشت شست و نشانه ی دست راست در حالی که انتهای لام دوم را با زاویه 45-30 درجه روی سطح لام اول نگه داشته اید به عقب بکشید تا با قطره خون تماس حاصل نماید ، اجازه دهید تا خون پخش شود و زاویه بین دو لام را پر نمایید سپس لام پخش کننده را با سرعتی متوسط به سمت جلو برانید تا خون به صورت گسترشی با نازکی متوسط پخش شود ، لام پخش کننده باید تمیز ، خشک و صاف باشد، چنانکه این لبه زبر باشد گسترش دنباله های دندانه دار خواهد داشت که مملو از لکوسیت هاست.

لام را باید به سرعت در هوا خشک کردبعد با نوشتن مشخصات با یک مداد می توان لام ها رو روی انتهای ضخیم لام نشانه گذاری کرد.

برای رنگ آمیزی لام تهیه شده روش های مختلف با استفاده از رنگ رایت ، گیسماو .. می باشد.که رنگ گیمسا جز عالیترین رنگ ها برای رنگ آمیزی می باشد که ابتدا اسمیر تهیه شده را با اتانول فیکس میکنیم و با رنگ تهیه شده به نسبت1 به 20رنگ آمیزی میکنیم، بهتر است ظرفی پر از رنگ کرده و لام ها در یک سبد مناسب گذاشته شود و کل لام درون ظرف قرار بگیرد ، در این روش با رنگ فراوان جلوی رسوب ناشی از تبخیر گرفته میشود ،زمان رنگ آمیزی حدود 20 دقیقه می باشد که به صورت تجربی می توان این زمان را + یا _ ،20 تغییر داد.

عوامل مداخله کننده در رنگ آمیزی:

- آبی شدن بیش از اندازه : الف: گسترش ضخیم ب: افزایش مدت زمان رنگ آمیزی ج: شستن ناکافی
- صورتی شدن بیش از اندازه :الف : رنگ آمیزی ناقص ب:طولانی بودن مدت شستشو
- رسوب روی گسترش: الف: لام های کثیف ب: خشک شدن اسمیردر طول دوره رنگ آمیزی ج: شستشوی ناکافی در انتهای رنگ آمیزی د: صاف نکردن کافی رنگ و نشستن غبار روی لام یا گسترش

بعد از رنگ آمیزی لام را از نظر مرفولوژی SRBC و درصد سلو ل های سفید مورد بررسی قرار می دهیم که آشنایی با آنمی ها مرفولوژی RBC ها به ما کمک میکنند در گزارش یک لام خون محیطی که با توجه به نتیجه CBC بیمار می توانیم از صحت گزارش خود تا حدی اطمینان حاصل کنیم.

مشاهده زیاد گسترش های خون محیطی طبیعی به ما کمک میکنند که بسیار راحت با دیدن یک گسترش غیر طبیعی متوجه غیر طبیعی بودن آن شویم.

شدت رنگ آمیزی سلول ، راهنمای تقریبی از میزان هموگلوبین در RBC ها به ما میدهد.

واژه نورموکروم : شدت رنگ آمیزی طبیعی

واژه هیپوکروم : با کاهش هموگلوبین ناحیه کمرنگ مرکزی بزرگتر و کم رنگ تر می شود.

واژه هیپرکروم : با افزایش هموگلوبین ، RBC ها بزرگتر و در نتیجه ضخیم تر می باشند و شدیدتر رنگ می گیرند و در ناحیه مرکزی کم رنگ بودن کاهش می یابد.

واژه آنیزوکروم : وجود سلول های هایپوکروم و نرموکروم در یک گسترش که گاهی کم خونی دیمورفیک یا دورریختی است.

واژها :

میکروسیت : کوچک بودن غیر طبیعی RBC

ماکروسیت : بزرگ بودن RBC
آنیزوسیتوز : تنوع غیر طبیعی RBCها در اندازه که خصوصیت اکثر آنمی ها ست
پوئی کیلوسیتوزیس : هر سلول دارای شکل غیر طبیعی ، یک پوئی کیلوسیت است.
سلول قطره اشکی (Tear -drop) ، سلول های بیضی (الیپتوسیت) ،اریتروسیت تقریبا کروی شکل (اسفروسیت) که گزارش آنها در لام های خون محیطی نوزادان حایز اهمیت می باشد.

Target cell که بهRBC ها یی که قطر آنها افزایش دارد. در رنگ آمیزی لبه ی محیط و ناحیه مرکزی تیره می باشد.
شیستوسیت ها سلول های تکه های که به صورت درصد گزارش می گردد.
سلول های خار دار Bur cells RBC ها یی که به طور نامنظم چروکیده شده اند.اگر خار های نامنظم انتهایی خارشان گرد یا حبابی شکل باشه آکانتوسیت و در صورتی که چروکیده گی منظم باشد آکینوسیت گزارش میشود.
تشکیل رولو: قرار گرفتن RBCها بر روی یکدیگر به نحوی که به سکه ها روی هم انباشته شباهت دهند.
NRBC: RBCهای هسته دار، این سلو ل ها به طور طبیعی در خون نوزادان دیده میشه که البته با مشاهده آنها باید تعداد WBCهای بیمار تصحیح میشه، بدین صورت که در شمارش 100 سلول WBC جداگانه تعداد NRBC ها شمارش و طبق فرمول تصحیح می گردد.

در بزرگسالان این سلول ها در مواقع بیماری ظاهر می گردد که گزارش آنها حایز اهمیت است .

بررسی لکوسیت هاWBC ها:

ابتدا یک بررسی اجمالی در لام می شود دقت نمایید منطقه ی مناسبی جهت بررسی سلول ها انتخاب نمایید . یادگیری جهت سلول های طبیعی به کمک عدسی 100 و با روغن بهتر می باشد.
سلول هایی که به طور طبیعی در خون وجود دارند 1-نوتروفیل 2- ائوزینوفیل 3-بازوفیل 4- مونوسیت 5- لنفوسیت می باشد.
یادآوری می شود با مشاهده زیاد لام های طبیعی متوجه غیر طبیعی بودن سلو ل ها خواهیم شد، مثلا لنفوسیت های آتیپیک ، بلاست ها که تایید میشود گزارش آنها با تایید پاتولوژیست باشد.

پلاکت ها:

درخواست پزشک در شمارش دستی پلاکت به صورت Visual Plt.
پلاکت ها شکل گرد ، یا بیضی دارند ، قطر 4-2 میکرومتر است.
برای شمارش پلاکت از روی لام توجه کنید در 10 ناحیه که در ان RBCها کاملا جدا از هم می باشند تعداد پلاکت ها شمارش می شود و میانگین در 20 هزار ضرب می شود.
مشاهده Giant plt , Clump pltدر گزارش پلاکت تاثیر دارد.

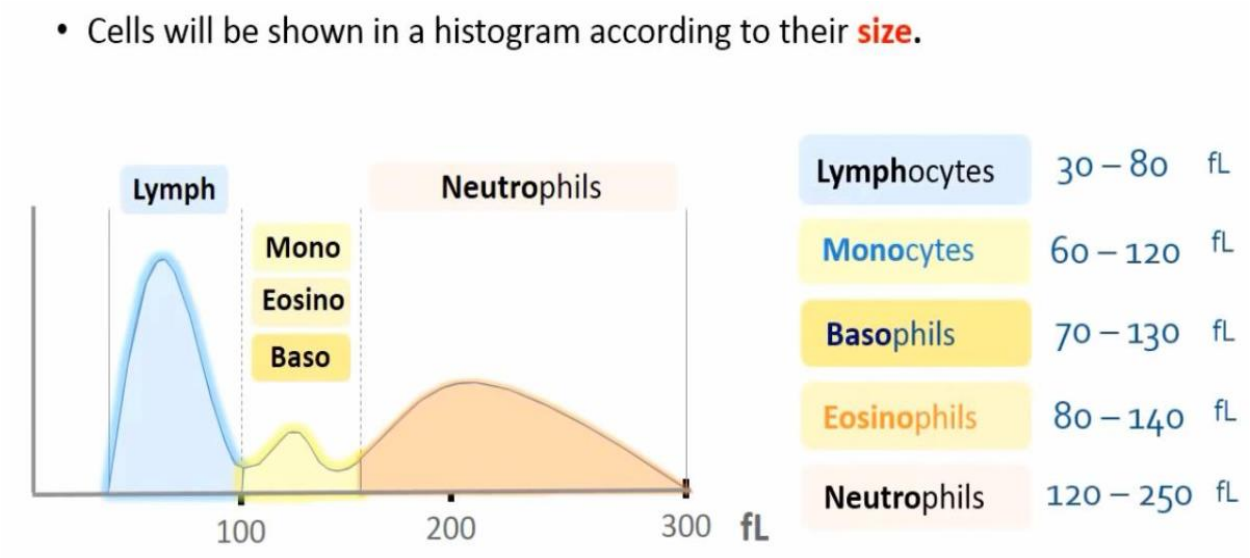
انجام آزمایش CBC :

در نسخه بیماران این آزمایش به صورت CBC diff درخواست میگردد.

نمومه CBC حاوی EDTA می باشد که این ظرف خط نشان دارد و خون تا خط نشان ریخته میشود و ابتدا ویال سروته می گردد تا لخته نشود ، قبل از انجام هم در بخش هماتولوژی دقت شود که ابتدا نام و نام خانوادگی بیمار چک شود و نمونه از نظر وجود لخته با اپلیکاتور چک شود و خوب هم زده شود سپس به دستگاه داده شود.

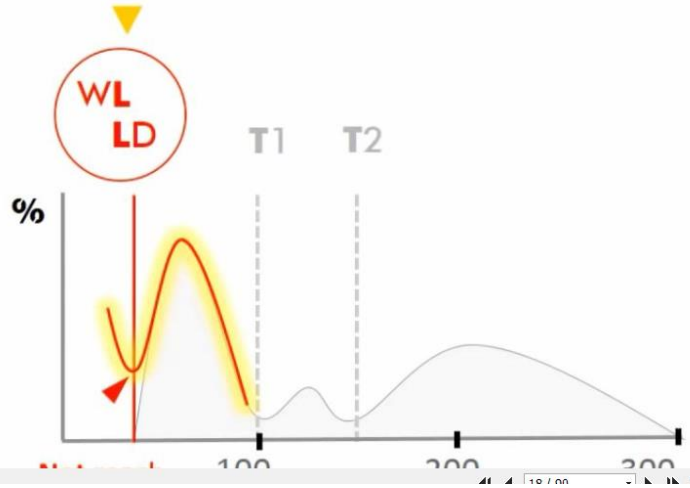
به اندکس های خوانده شده توسط دستگاه دقت شود و در صورت مشاهده هر گونه Flag اقدامات اصلاحی انجام شود تا گزارش درستی به بیمار داده شود.

هیستوگرام طبیعی WBCها:



1 LD Flag (WL Flag)

WBCs Histogram
3-Part Differentiation



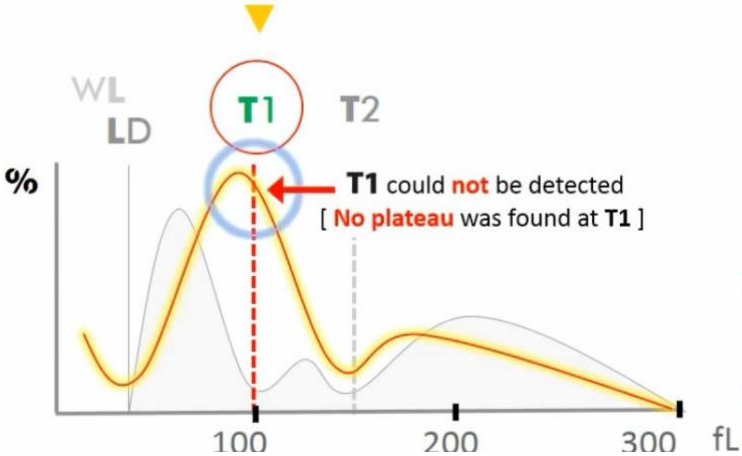
Curve **does not start** at base line

Possible Causes :

- PLT **Clumps** — Clotted sample / EDTA-Incompatibility [Re-collect on citrate]
- **Giant** Platelets
- **Nucleated** RBCs
- **Lyse-resistant** RBCs
- Cryoglobulins

3 T1 Flag

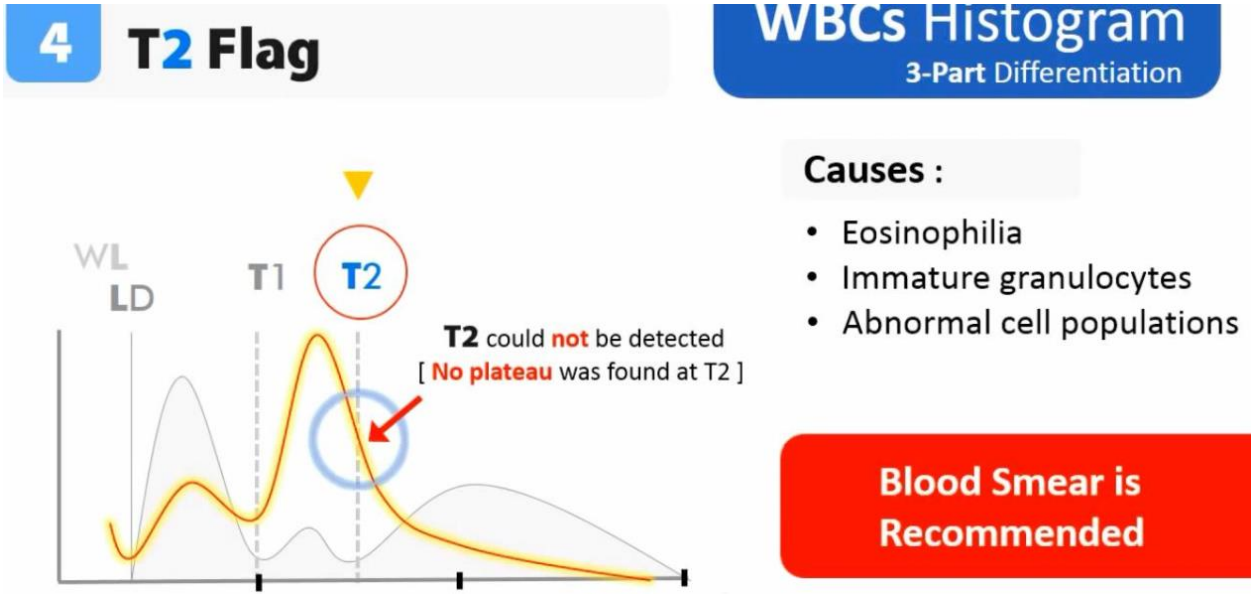
WBCs Histogram
3-Part Differentiation



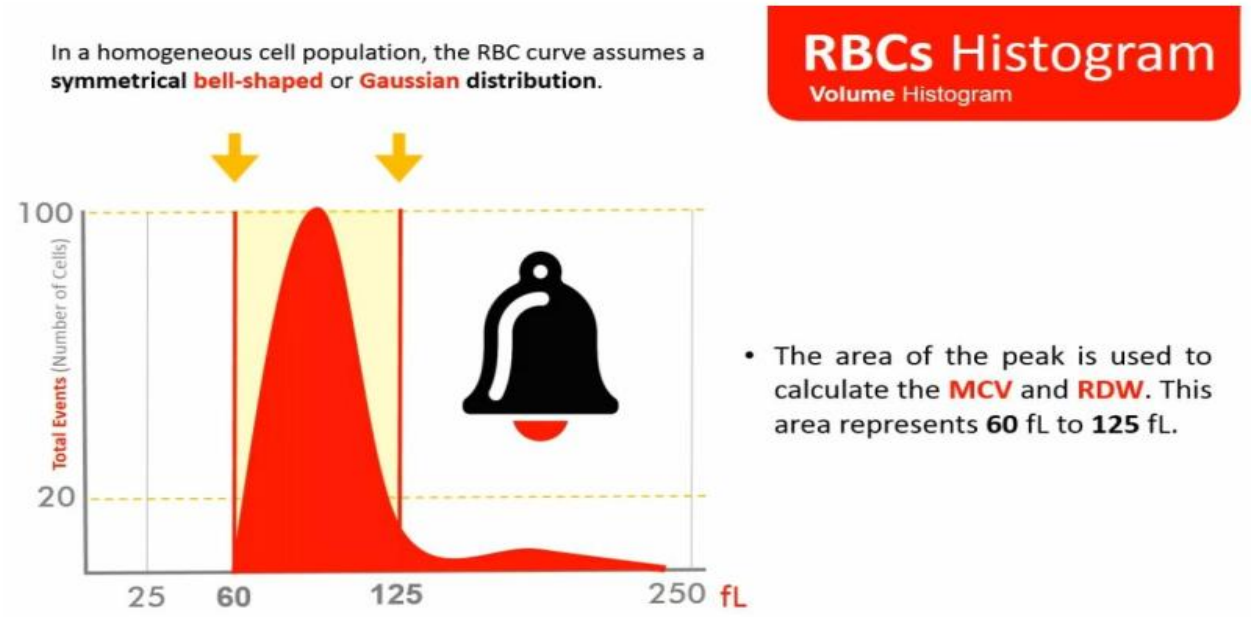
Causes :

- Blast cells
- Eosinophilia
- Basophilia
- Plasma cells
- Abnormal/variant lymphs

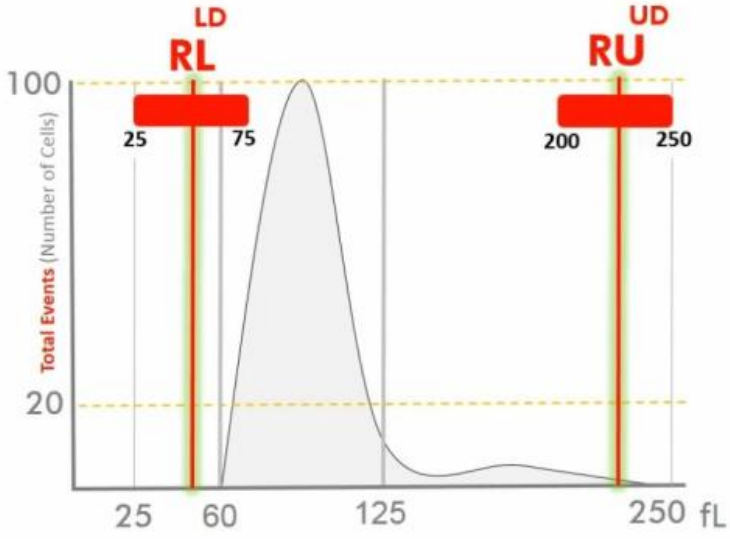
Blood Smear is Recommended



هیستوگرام های RBC:



Red Cell **Discriminators**



RBCs Histogram

Volume Histogram

The RBC histogram has **2** **Flexible** discriminators that discriminate RBC curve from other curves.

RL (**RBC** **Low** Discriminator)

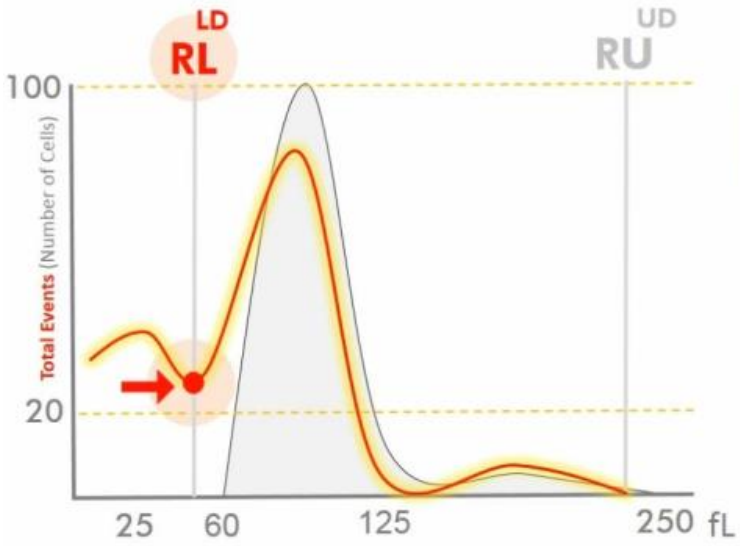
Fluctuates between **25** and **75** fL

RU (**RBC** **Upper** Discriminator)

Fluctuates between **200** and **250** fL

Flag 1 **RL Flag**

LD Flag



RBCs Histogram

Volume Histogram

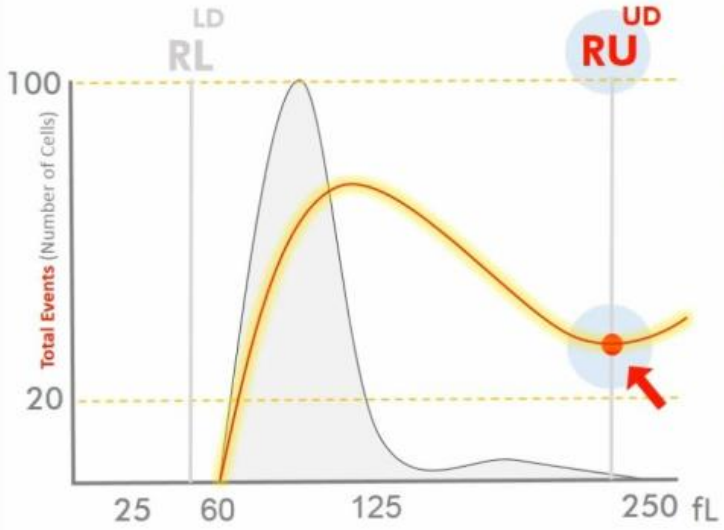
- **Abnormal** Height at **LD**
- The LD exceeds the preset height by **> 10 %**

Possible Causes :

- **Platelet** Clumps
- **RBCs** fragments
- Giant **Platelets**
- Micro **RBCs**

Flag 2 **RU Flag**

UD Flag



RBCs Histogram

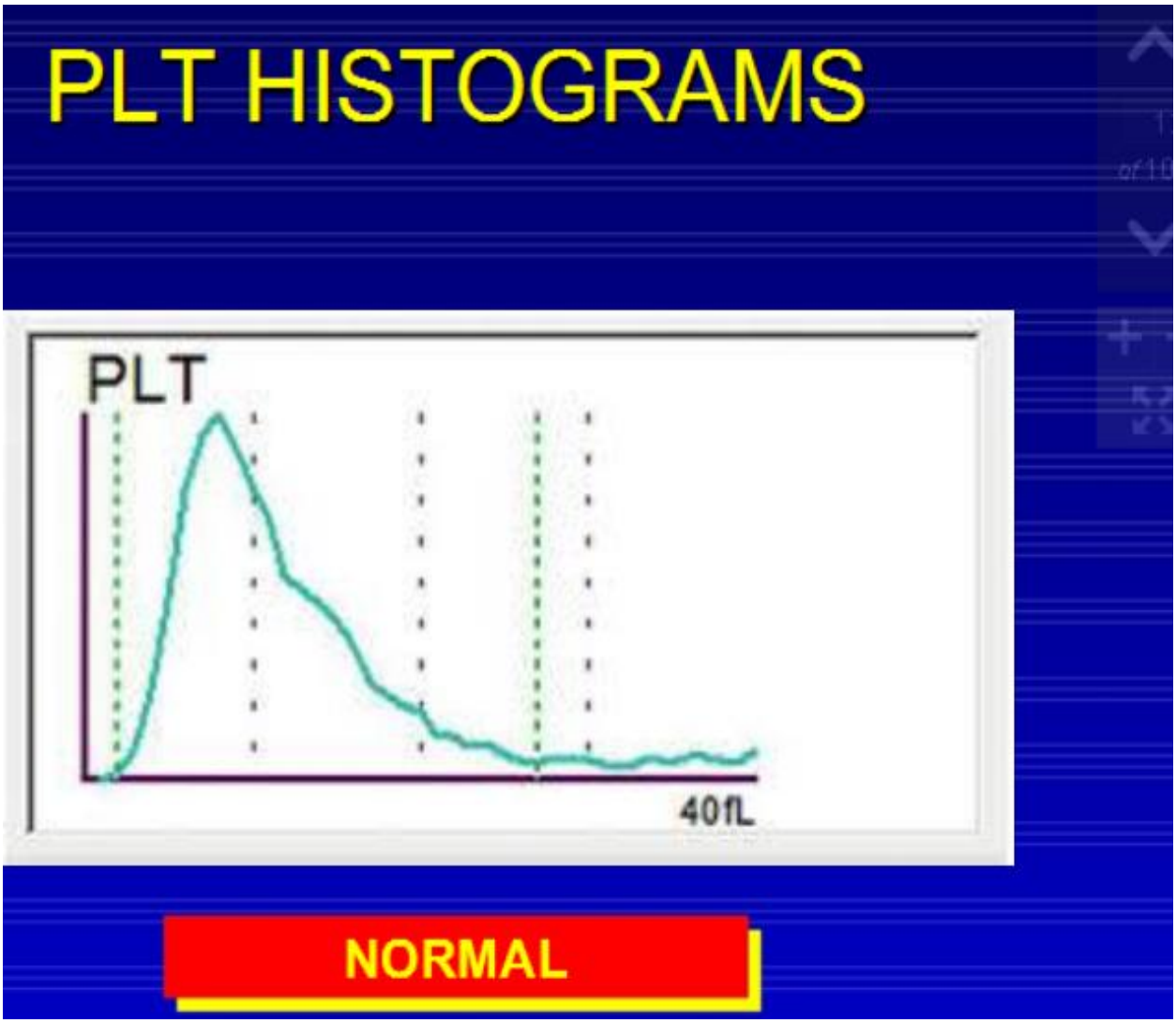
Volume Histogram

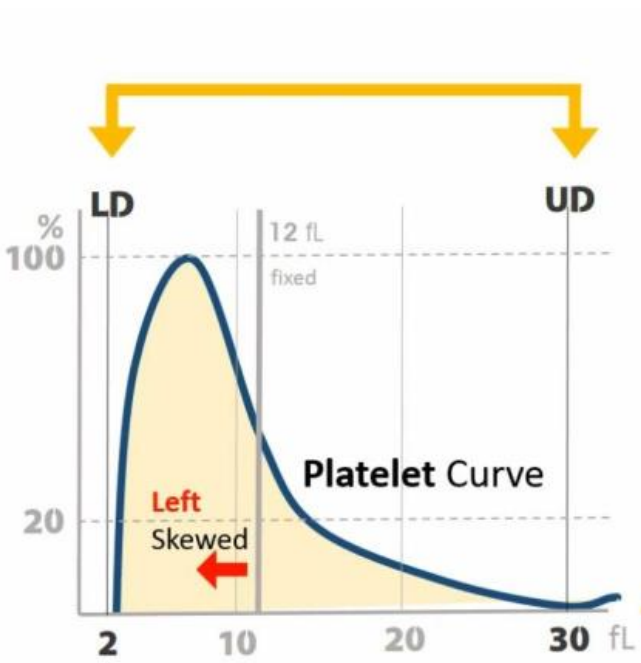
- **Abnormal** Height at **UD**
- The UD exceeds the preset height by **> 5 %**

Possible Causes :

- **RBCs** Agglutination
- **Cold** Agglutinins — disappears when these samples are incubated at room temperature
- Nucleated **RBCs**
- **CLL** — When small lymphoid cells are present in a very high number

هیستوگرام پلاکت :





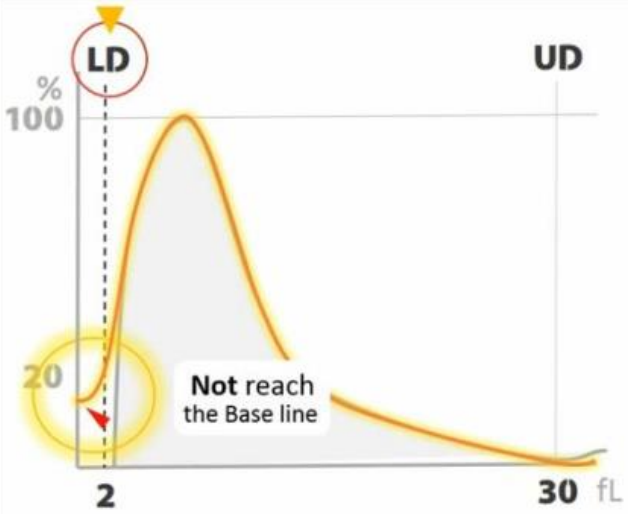
Platelet Histogram

- The platelet histogram curve should lay **within** the **LD** and **UD**.

Normally, The platelet curve is **left-skewed**.

The platelet histogram curve **starts** and **ends** on the **base line**.

1 LD Flag (PL Flag)



Platelet Histogram

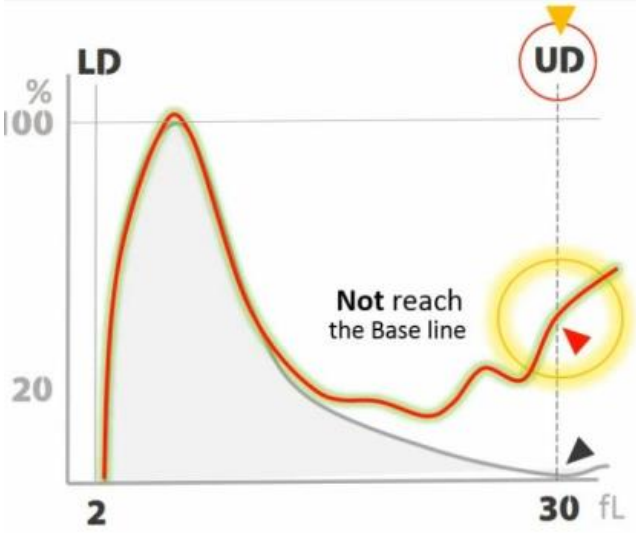
This flag appears when lower discriminator (LD) exceeds **preset height** by **10%.**

Possible Causes :

- High blank value
- Cell fragments
- Contaminated reagent
- High numbers of bacteria

2 UD Flag (PU Flag)

Platelet Histogram



- Abnormal **height** at upper discriminator.
- This flag appears when UD exceeds the preset height by **> 40% .**

Possible Causes :

- PLT **Clumps** | Clotted sample | EDTA-Incombatibility
  [Re-collect on citrate]
- **Giant** Platelets
- Micro RBCs

انجام کنترل کیفی در بخش خون شناسی:

خون کنترل به صورت اماده تهیه می شود و بایستی در یخچال نگهداری شود . هنگام استفاده از خون کنترل بایستی انرا نیم ساعت در دمای اتاق قرار دهیم و به صورت چند بار نمونه را دست سرو ته کنیم، سپس نمونه را به دستگاه داده جواب پرینت شده و اعداد بدست آمده در نرم افزاز هماتولوژی وارد شود و نمودار آن رسم شود.

همیشه به LOT NOMBER خون کنترل توجه شود که با تغییر آن تغییرات احتمالی در نرم افزار لحاظ شود.

انجام آزمایش Sickle prep:

200 میلی گرم متا بی سولفیت سدیم را در 10 سی سی آب مقطر حل میکنیم ،یک قطره از محلول و یک قطره خون CBC روی لام ریخته و لامل روی آن گذاشته و دور لامل را چسب سیتولوژی ریخته و بعد از یک ساعت از نظر داسی بودن RBCها زیر میکروسکوپ بررسی میکنیم در صورت مثبت شدنRBC ها داسی شکل میشوند،در صورت منفی شدن بعد از 3 ساعت لام مجددا بررسی میشود.

تهیه و بررسی گسترش خون محیطی در تشخیص مالاریا:

بهترین نمونه جهت تهیه گسترش خونگیری از نوک انگشت بیمار است چرا که در نمونه های حاوی EDTA به طور کاذب منفی زیاد می باشد.

برای بررسی مالاریا یک گسترش نازک و یک گسترش ضخیم تهیه میشود.

در رنگ آمیزی دقت شود گسترش ضخیم نیاز به فیکس کردن ندارد و هردو گسترش را میتوان روی یک لام تهیه کرد به طوری که برای گسترش ضخیم در یک طرف لام یک قطره خون گذاشته و با گوشه یک لام دیگر آن را به اندازه یک سکه ریالی پهن میکنیم و این عمل را 30 ثانیه تکرار میکنیم تا از تشکیل فیبرین جلوگیری شود.

گسترش نازک را با گذاشتن یک قطره بعد از گسترش ضخیم به همان صورتی که قبلا گفتیم میکشیم.

برای بررسی مالاریا در اسمیر خون محیطی بت عدسی100 تمام لام را نگاه میکنیم و حتما باید چند مورد تیپیک از تک یاخته مشاهده شود تا گزارش شود چون در بعضی موارد وجود اجسامی مانند پلاکت و گرد و غبار ممکن است با انگل اشتباه گرفته شود لذا به صرف دیدن یک مورد مشکوک نباید اقدام به گزارش کرد.

روش انجام آزمایش G6PD:

با مطالعه بروشور کیت محلول را آماده میکنیم ، برای نگهداری محلول با توجه به دستور بروشور و مدت زمان پایداری آن در یخچال یا فریزر نگهداری میکنیم.

100 لاندا از محلول آماده را با10 لاندا از خون داخل لوله ریخته و پس از 10 دقیقه در دمای اتاق یک قطره از آن را روی کاغذ صافی مخصوص که داخل کیت است قرار می دهیم و پس از خشک شدن زیر اشعه UV تغییر رنگ را بررسی میکنیم رنگ آبی نشانه نرمال بودن و رنگ قرمز نشانه عدم وجود آنزیم است.

نرمال بودن که نشانه کافی بودن آنزیم است به صورت Sufficient گزارش میشود.

ضعیف نسبی به صورت Partially deficient گزارش میشود.

بسیار ضعیف به صورت Severely deficientگزارش میشود

از نمونه خون فرد سالم به عنوان کنترل استفاده میشود.

بررسی سرعت رسوب گلبول قرمزESR:

جهت انجام این آزمایش دستگاهای مختلفی وجود دارد.

نمونه گیری در لوله سیتراته 3/8.

پایداری نمونه برای انجام این آزمایش 2 ساعت دمای اتاق ریال12 ساعت دمای یخچال.

با وجود دستگا های مختلف انجام این آزمایش با پیپت سدیمال یا وستر گرین کنترل کیفی دستگاه انجام میشود.

پیپت سدیمان تا علامت صفر از خون پر شود روی پایه سدیمان در حرارت اتاق روی سطح بدون ارتعاش و بدون تماس مستقیم با نور قرار میدهیم بعد از 60 دقیقه فاصله بین علامت صفر تا راس ستون گلبول قرمز بر حسب میلی متر گزارش میشود .

در صورت وجود کدورت در محدوده بین پلاسما و ستون گلبول قرمز اولین جایی از ستون که تراکم کامل داشته باشد سطح ESR محسوب میشود.

شمارش سلول مایعات :

برای شمارش سلول مایعات از لام نئوبار استفاده میشود.

ابتدا نمونه هموژن شود، سپس یک قطره از مایع بین لام و لامل ریخته شود و شمارش انجام شود.

برای شمارش WBC خانه های مربوط به WBC شمارش و تعداد در 2/5 ضرب شود، در شمارش خانه های 16 تاییWBC های روی خط ها فقط 2 ضلع از مربع وWBC هایی که به سمت داخل هستند شمارش شود.

در شمارش RBCها از خانه های وسط 5 تا را شمارش کرده و با استفاده از فرمول زیر RBCها گزارش شود.

تعداد شمارش شده ضرب در 5 ضرب در 10.

بعد از شمارش جهت Diff کردن WBC ها نمونه را 10 دقیقه با دور 3500 ساتریفیوژ کرده بعد مایع رویی را جدا میکنیم و برای انجام تست های بیوشیمی ، و از رسوب آن لام تهیه و رنگ آمیزی میکنیم ، زمان رنگ آمیزی مایعات 3-2 دقیقه است.

دستورالعمل روش انجام آزمایش CSF S & C

هدف:

اطمینان از روش صحیح CSF از نظر میکروسکوپی و کشت

دامنه کاربرد:

این دستورالعمل جهت انجام صحیح CSFاز نظر میکروسکوپی و کشت در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.

نمونه لازم و موارد رد نمونه :

نوع نمونه : مایع مغزی نخاعی

اساس آزمایش :

روش انجام آزمایش :

آزمایش مستقیم:

الف) بررسی ماکروسکوپی: مایع نخاع طبیعی شفاف و بیرنگ بوده و میزان چسبندگی آن مانند آب است.

ب) بررسی میکروسکوپی: نمونه رامستقیماً به لام شمارش منتقل نموده و گلبولهای قرمز و سفید آن را شمارش می نمائیم. با شمارش گلبولهای قرمز می توانیم به میزان آلوده شدن مایع نخاع باخون پی ببریم و در نتیجه لکوسیت های مایع نخاع را تصحیح نماییم.

شمارش افتراقی : جهت شمارش افتراقی سلولها نمونه را با دور کم (2000) به مدت 5-3 دقیقه سانتریفوژ کرده، از رسوب آن اسمیر تهیه نموده و رنگ آمیزی گیمسا یا ژیت بر روی آن انجام می دهیم. برای بررسی میکروسکوپی مایع نخاع از نظر میکروبی از رسوب مایع نخاعی اسمیر تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم از آن به عمل می آوریم.

کشت:

کشت مایع مغزی ـ نخاعی در محیط های بلادآگار و شکلات آگار در حضورCO_2، 10-5٪ صورت می گیرد. تمام محیط ها باید تا 3 روز نگهداری شوند. کریپتوکوکوس نئوفورمنس در محیط بلادآگار در عرض 1 هفته رشد می کند. در موارد مشکوک به عفونت های قارچی می توانیم نمونه مغزی نخاعی را در محیطBHI کشت داده و پس از 4 ساعت محیط را بررسی نماییم.

نحوه کشت:

نمونه را به مدت 15 دقیقه در دور 1500 gسانتریفوژ کنید.

مایع رویی را دور، رسوب را مخلوط کنید.

روی محیط های CA, MC, B.Aو تایوگلیکولات کشت دهید.

پلیت ها را به مدت 72-48 ساعت در کندل جار در انکوباتور 35 درجه سانتیگراد قرار دهید *.برای تشخیص هموفیلوس، روی پلیت B.Aاستافیلوکوک اورئوس را به صورت خطی نشان دهید.

محیط تایو 5 روز بررسی شده و به محض دیدن کدروت کشت هوازی، بی هوازی انجام شود

تفسیر نتایج :

تشخیص مننژیت های مختلف باکرتیایی، قارچی، ویروسی و سلی از موارد درخواست تست CSFاست. عوامل ایجاد کننده مننژیت باکتریایی بر حسب گروه سنی شامل موارد زیر می باشد:

الف) نوزادان تا 2 ماهگی:

- اشرشیاکلی
- سالمونلا
- استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه B
- لیستریا منوسیتوژن

ب) سایر گروه های سنی:

- هموفیلوس آنفولانزا
- نایسریا مننژیتیدیس

- استرپتوکوک پنومونیه
- مایکوباکتریوم توبرکلوزیس
- لیستریا منوسیتوژن
- استافیلوکوک

از قارچ هایی که می توانند عامل مننژیت باشند نیز می توان کریپتوکوکوس نئوفورمنس را نام برد .پولیومیلیت، هاری و برخی از آربو ویروسها نیز می توانند عامل مننژیت ویروسی باشند.
در بررسی ماکروسکوپی مایع نخاع طبیعی شفاف و بی رنگ بوده و میزان چسبندگی آن مانند آب است

دستورالعمل روش انجام آزمایشAbscess Fluid S & C

هدف:
اطمینان از روش تشخیص علت عفونی در آبسه های چرکی به وسیله آزمایش های میکروسکوپی و کشت عامل بیماریزا

دامنه کاربرد:
این دستورالعمل جهت بررسی علت آبسه های چرکی به روش میکروسکوپی و کشت در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.

نمونه لازم و موارد رد نمونه :
نوع نمونه : چرک زرد رنگ متمایل به سبز، مواد ژلاتینی قرمز متمایل به قهوه ای
- نحوه نمونه گیری: نمونه گیری توسط پزشک صورت می گیرد تا با سوزن مخصوص اقدام به آسپیراسیون آبسه و تخلیه آن می کند.

روش انجام آزمایش :
بررسی میکروسکوپی و مستقیم:
پس از تهیه اسمیر از نمونه و رنگ آمیزی گرم آن را از نظر وجود عوامل بیماریزا مورد بررسی قرار می دهیم.
از لام مرطوب برای بررسی تروفوزوئیت آمیب در تشخیص آمیبیاز کبدی می توان استفاده کرد.

کشت:
کشت در محیط بلادآگار، مکانکی و تایوگلیکولات انجام می شود.

دستورالعمل روش انجام آزمایشSynovial Fluid S & C

هدف:
اطمینان از روش تهیه کشت و بررسی میکروسکوپی مایع مفصل و تشخیص احتمالی عفونت در این مایع

دامنه کاربرد:

این دستورالعمل جهت انجام آزمایش میکروسکوپی و کشت مایع مفصل در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.

نمونه لازم و موارد رد نمونه :

نوع نمونه : مایع مفصلی که به صورت آسپیراسیون تهیه شده است.

نحوه نمونه برداری: نمونه برداری فقط توسط پزشک و از شانه، انگشتان، مفصل های آرنج، مچ، ران و زانو صورت می گیرد.

علل رد نمونه:

مصرف آنتی بیوتیک

تماس مایع با پنبه سر لوله

روش انجام آزمایش :

آزمایش مستقیم:

بررسی ماکروسکوپی: نمونه طبیعی مایع مفصل شفاف، بی رنگ یا زرد کم رنگ است و در صورت بیماری زردرنگ، قهوه ای، سبز یا قرمز رنگ دیده می شود. از نظر توانایی ایجاد لخته موسینی و ویسکوزیته مایع مفصل نیز مورد بررسی قرار می گیرد.

-2-1-8بررسی میکروسکوپی: شمارش گلبول سفید: نمونه را به لام شمارش منتقل نموده و گلبولهای سفید آن مورد شمارش قرار می گیرند. در صورت ایجاد تداخل توسط گلبول قرمز از اسید کلریدریک 0/1 نرمال یا سرم فیزیولوژی 3 در هزار جهت رقیق کردن نمونه استفاده می نماییم. تعداد طبیعی گلبول سفید در مایع مفصل 200-150 عدد در میکرولیتر است.

شمارش افتراقی : نمونه را به مدت 5 دقیقه با دور کم (1500) سانتریفوژ کرده و از رسوب آن اسمیر تهیه نموده و به روش رایت یا گیمسا رنگ می کنیم. در مایع مفصل طبیعی 65٪ سلولها را منوسیت ها، 15٪ لنفوسیت و حدود 20٪ را نوتروفیل ها تشکیل می‌دهند.

بررسی بلورها: یک قطره مایع مفصل را روی لام ریخته و روی آن لامل می گذاریم. اطراف آن را با لاک ناخن می پوشانیم و با عدسی 40 مورد بررسی قرار می دهیم. مایع مفصل طبیعی فاقد کریستال بوده و در قالب بیماری می توان کریستالهای اورات منوسدیم، اگزالات کلسیم، کلسترول، چربی را مشاهده نمود.

رنگ آمیزی : از نمونه مورد آزمایش اسمیر تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی نموده (به Sopرنگ آمیزی گرم مراجعه شود). کشت: سینوویال را به مدت 15 دقیقه 3000 rpmسانتریفوژ کرده و مایع رویی را برمیداریم.

از رسوب آن روی محیط های Tio, CA, MC, BAکشت می دهیم.

محیط تایو 5 روز بررسی شده و به محض دیدن کدورت کشت داده می شود.

در صورت درخواست پزشک برای بررسی باسیل سل از محیط کشت لونشتاین جانسون و رنگ آمیزی ذیل نلسون استفاده می‌شود.

تفسیر نتایج :

بررسی آزمایشگاهی مایع مفصلی در ارز یابی کامل اختلالات مفصلی ضروری بوده و این امکان را ایجاد می کند که بر مبنای تعداد لکوسیت ها و درصد نوتروفیل ها سینوویت به دو نوع التهابی عفونی و غیرعفونی تقسیم بندی می شود.

دستورالعمل روش انجام آزمایشPeritoneal Fluid S & C

هدف:

اطمینان از روش بررسی صحیح بررسی عامل پریتونیت از نظر میکروسکوپی و کشت

دامنه کاربرد:
این دستورالعمل جهت بررسی عامل پریتونیت از نظر میکروسکوپی و کشت در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.

نمونه لازم و موارد رد نمونه :
نوع نمونه : مایع آسیت

اساس آزمایش :
روش انجام آزمایش :
آزمایش مستقیم:
بررسی ماکروسکوپی: مایع آسیت طبیعی، ترانسودا، زرد کم رنگ و شفاف است . در حالیکه در عفونت ها و بیماری، اگزودا و کدر می باشد. وجود 15 mlخون در یک لیتر مایع آسیت آن را کاملاً قرمز و کدر می کند. اگر کدورت موجود در مایع آسیبت، با سانتریفوژ نمودن از بین نرود می تواند ناشی از مواد شیلی یا شبه شیلی باشد. اگر خون آلود بودن نمونه به علت ضربه و نمونه برداری نباشد، نشان دهنده بدخیمی یا سل است.
بررسی میکروسکوپی: شمارش سلولی: شمارش سلولی از گلبولهای قرمز و سفید به عمل می آید. شمارش گلبولهای سفید می تواند در تشخیص سیروز از پریتونیت باکتریایی مفید باشد. در افراد مبتلا به پریتونیت باکتریایی خود به خود در 90درصد موارد بیش از 500 عدد گلبول قرمز در هر میکرولیتر مایع آسیت وجود دارد.
شمارش افتراقی : شمارش افتراقی پس از تهیه اسمیر از رسوب مایع آسیت و رنگ آمیزی رایت یا گیمسا انجام می گیرد. در پریتونیت باکتریایی بیش از 50%گلبولهای سفید را نوتروفیل ها تشکیل می دهند. همچنین در شمارش افتراقی باید سلولهای بدخیم را در صورت وجود مورد بررسی قرار داد.
رنگ آمیزی : برای تشخیص باکتریهای ایجادکننده پریتونیت از مایع آسیت رنگ آمیزی گرم به عمل می آوریم.
کشت: کشت در محیط های متداول میکروب شناسی و محیط کشت خون و همچنین درصورت نیاز در محیط لونشتاین جانسون صورت می گیرد.

دستورالعمل روش انجام آزمایشSemen Fluid Culture

هدف:
اطمینان از انجام صحیح آزمایش کشت اسپرم

دامنه کاربرد:
این دستورالعمل جهت انجام صحیح آزمایش کشت اسپرم در بخش میکروبیولوژی و آنالیز ادرار آزمایشگاه کاربرد دارد.

نمونه لازم و موارد رد نمونه :
نوع نمونه : اسپرم
نحوه نمونه گیری: بیمار قبل از انجام آزمایش مثانه خود را تخلیه تا میکروب هایی که در طول مجرای ادرار وجود دارندخارج شوند. بیمار خود را خوب شسته و از طریق استمناء اسپرم خود را گرفته و سعی نماید که سر آلت تناسلی به اطراف ظرف استریل آزمایش برخورد نکند.

اساس آزمایش :

روش انجام آزمایش :

بعد از 20 دقیقه از نمونه گیری اسپرم را در محیط های BAو GCو EMBو تایو به مدت 48 ساعت در کنترل جار قرار دهید.

تفسیر نتایج :

عفونت می تواند اندام های تولیدمثل رادر مردان درگیر کند. این عفونت ها عبارتند از التهاب اپیدیدیوم، پروستات و بیضه.

آزمایش های رایج انعقادی

به منظور ارزیابی و شناسایی علت خونریزی ضروری است عوامل سیستم انعقاد، سیستم فیبرینولیتیک، شمارش پلاکت ها و عملکرد آنها مورد سنجش قرار گیرد

دوآزمایش PT و PTT از متداول ترین آزمایش های انعقاد خون هستند .

زمان پروترومبین (PT : Prothrombin Time)

هدف:

- ✓ ارزیابی فاکتور های انعقادی مسیرهای خارجی و مشترک در سیستم انعقادی
- ✓ بررسی توانایی ایجاد لخته توسط فاکتورهای 1 و 5 و فاکتورهای وابسته به ویتامین K (2، 7، 9، 10)
- ✓ حساسیت بیشتر نسبت به آزمون **PTT** در بیماری های کبدی و کمبود ویتامین K

جهت اندازه گیری زمان **PT**، ترومبوپلاستین بافتی و یون کلسیم به پلاسمای بیمار اضافه شده و زمان صرف شده جهت انعقاد پلاسما اندازه گیری می شود. آزمایشPT همه مسیر فیزیولوژیک انعقاد را بررسی نمی کند.

تست **PT** در کنار اندکس INR (*International Normalized Ratio*) ارزشمند می باشد.

در واقع به دلیل تفاوت بین شرکت های تولید کننده فاکتور بافتی، برای استاندارد کردن **PT** از اندکس **INR** استفاده می شود.

واحد INR یا نسبت همسو شده بین‌المللی یکی از شیوه‌های گزارش آزمایش PT بوده که بر مبنای معرف فاکتور بافتی استاندارد شده با معرف بافتی مرجع WHO می‌باشد.

به بیان دیگر اگر آزمایش PT بیمار با معرف بافتی مرجع انجام شود نسبت PT بیمار به کنترل برابر INR می‌گردد.

$$INR = (\frac{PT_{test}}{PT_{normal}})^{ISI}$$

ISI یا نشانگان حساسیت بین‌المللی:

حساسیت معرف PT به کمبود فاکتورهای وابسته به ویتامین K در مسیر خارجی را نشان می‌دهد و مقدار آن از عدد 1 تا 3 متغیر است .

هر چه مقدار عددی ISI به یک نزدیک شود بیانگر حساسیت بسیار بالای معرف می باشد و چنانچه به عدد 3 نزدیک شود بیانگر کاهش حساسیت آن خواهد بود.

بیمارانی که از داروهای ضدانعقاد استفاده می کنند، باید ***INR*** آنها 2 تا 3باشد.

برای بیمارانی که در معرض خطر تشکیل لخته هستند، نیاز است که INR بالاتر و حدود 2/5 تا 3/5 باشد. در حقیقت پزشک از INR برای تنظیم دارو استفاده می کند تا PT را در محدوده مناسب برای بیمار قرار دهد.

افزایش زمان PT :

افزایش زمان PT در بیماریهای سیروز کبدی، هپاتیت، کمبود ویتامین K، مسمومیت با سالیسیلات ها، انسداد مجاری صفراوی، مصرف کومارین، انعقاد منتشر داخل عروقی (DIC)، انعقاد وسیع خون و کمبود ارثی فاکتورهای انعقاد خون مشاهده می شود.

عوامل مداخله کننده :

ورزش، مصرف الکل و کشیدن سیگار می تواند زمان PT را طولانی کند.

جگر گاو و خوک، سبزیجاتی مانند کلم بروکلی، گل کلم، شلغم و کاهو سرشار از ویتامین K هستند و مصرف آنها زمان PT را طولانی می کند.

رژیم پرچربی، زمان PT را کاهش می دهد.

داروهایی که باعث افزایش زمان PT می شوند :

آلوپورینول، آمینوسالیسیلیک اسید، باربیتورات ها، آنتی بیوتیک های گروه
بتا لاکتام (آمپی سیلین، آموکسی سیلین، پنی سیلین ...) کلرال هیدرات، سفالوتین، کلرامفنکیل، کلرپرومازین، کلستیرامین، سایمتیدین، کلوفیبرات، کلستیپول، اتیل الکل، گلوکاگون، هپارین، متیل دوپا، نئومایسین، آنتی کواگولان های خوراکی، پروپیل تیوراسیل، کینین، سالیسیلات و سولفانامید ها

داروهایی که باعث کاهش زمان PT می شوند:

استروئید های آنابولیزان، باربیتورات ها، کلرال هیدرات، دیژیتال، دیفن هیدرامین، استروژن ها (قرص ضدحاملگی)، گریزئوفولوین، قرص های ضد بارداری خوراکی و ویتامین K

زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده

PTT: Partial Thromboplastin Time

Activated Partial Thromboplastin Time: aPTT; APTT

هدف:

- ✓ بررسی سیستم داخلی و مسیر مشترک در انعقاد خون
- ✓ ارزیابی فاکتورهای XII، HMWK، PK، XI، IX، VIII

افزایش زمان PTT :

کمبود مادرزادی یا اکتسابی فاکتورهای انعقادی (هیپوفیبرینوژنمی، بیماری فون ویلبراند و هموفیلی)، سیروز کبدی، کمبود ویتامین K، لوسمی، انعقاد منتشره داخل عروقی، تجویز هپارین

آزمایش PTT وابسته به تمام فاکتور های مسیر داخلی به جز فاکتور 7 و 13 است و کاهش 15 تا30 درصدی هر کدام از آنها موجب طولانی شدن آزمایش می گردد.

افزایش بیش از حد یک فاکتور انعقادی ممکن است آزمایش PTT را در حضور کمبود فاکتورهای دیگر انعقادی نرمال کرده و بر کمبود آنها پوشش گذارد. این حالت در افزایش شدید فاکتور 8 ممکن است رخ دهد.

فاکتورهای 8، فون ویلبراند و فیبرینوژن در گروه پروتئین‌های فاز حاد بوده و بیماری‌های التهابی منجر به افزایش سطح آنها می‌گردند.

کاهش زمان PTT :

در مراحل اولیه انعقاد داخل عروقی منتشره و کانسر پیشرفته مشاهده می گردد.

عوامل مداخله کننده :

داروهایی که زمان **PTT** را طولانی می کنند: آنتی هیستامین ها (دیفن هیدرامین، کلماستین و کلرفنیرامین، فکسو فنادین، لوراتادین، سیتریزین و آکرواستین)، اسید آسکوربیک، کلرپرومازین، هپارین و سالیسیلاتها

حضور لوپوس آنتی کواگولانت ممکن است منجر به طولانی شدن PTT گردد، در این حالت طولانی بودن PTT با خونریزی همراه نبوده و برعکس با خطر ایجاد ترومبوز همراه است.

نمونه گیری و شرایط نگهداری :

- نمونـــه خون لازم بر روی سیترات دو ســـود 3/8 درصد و به نسبـــت 1 به 9 (1 سی سی سیترات و 9 سی سی خون) گرفته می شود.
- فاصله زمان نمونه گیری تا انجام آزمایشات انعقادی وابسته به درجه حرارت نگهداری نمونه است.
- آزمایش ***PT*** با نگهداری نمونه خون در لوله در بسته دردمای 18 تا 24 درجه (نمونه سانتریفیوژ شده یا نشده) تا 24 ساعت از نمونه گیری بلامانع است.
- نگهداری پلاسما در 2 تا 4 درجه فاکتور 7 را فعال می کند وسبب کاهش PT به میزان 2 تا 3 ثانیه می شود. بنابراین نمونه PT در یخچال قرار داده نشود و درصورتی که امکان انجام آن تا 24 ساعت در دمای اتاق نباشد توصیه می شود حتما پلاسما جداشده و فریز گردد.
- پلاسما ی مربوط به بیماران تحت هپارین تراپی بایستی حداکثر تا یک ساعت از خون جدا گردد.
- انجام آزمایش PTT تا 4 ساعت برروی پلاسمای نگهداری شده در دمای 2 تا 4 بلامانع است.

چنانچه برای PT تا 24 ساعت و PTT تا 4 ساعت امکان انجام آزمایش نباشد، پلاسما را جدا کرده و این پلاسما تا دو هفته در 20- درجه و تا 6 ماه در دمای 70- پایدار است.

- پلاسمای فریز شده را بایستی به سرعت در 37 درجه ذوب نمود و در کوتاهترین زمان ممکن مورد آزمایش قرار داد.

- باتوجه به اینکه در اکثر موارد هردوآزمایش PT و PTT همزمان درخواست و خونگیری می شود بنابراین حداکثر تا 4 ساعت آزمایش ها انجام گردد.

منابع خطا :

- آسیب رساندن به رگ (عقب و جلوبردن سوزن هنگام خون گیری) باعث آزاد شدن فاکتور بافتی و کاهش کاذب زمان PTT و به خصوص زمانPT می شود.
- خونگیری از محل ست تزریق وریدی با توجه به هپارینه بودن برخی از این وسایل سبب افزایش زمان PT میشود.
- همولیز باعث فعال شدن مسیر انعقاد میشود، از خشک شدن الکل روی پوست هنگام نمونه گیری مطمئن شوید و از کشیدن ناگهانی پیستون سرنگ هنگام نمونه گیری اجتناب کنید.
- تغییرات PH باعث تخریب فاکتورهای انعقادی میشود بنابراین با بسته نگه داشتن درب لوله مانع از تغییرات PH شوید.
- ضد انعقاد سیترات سدیم تهیه شده باید در یخچال نگهداری شود.

- چنانچه هماتوکریت بیماری بیشتر از 55٪ باشد، بایستی مقدار سیترات با توجه به هماتوکریت تنظیم گردد، در غیر این صورت سیترات اضافی در حجم کم پلاسمای بیمار پرخون، با پیوند به کلسیم اضافه شده در هنگام آزمایش موجب طولانی شدن کاذب زمان آزمایش می‌شود.

برای محاسبه سیترات لازم در بیماران با هماتوکریت های بالا از فرمول زیر استفاده می شود; **(595-HCT) ÷ (100 -HCT) = حجم سیترات مورد نیاز**

- دمای انکوباتور برای آزمایش‌های انعقادی بایستی در محدوده 1 ± 37 درجه بوده و پلاسمای بیمار و کنترل هیچگاه قبل از انجام آزمایش‌های انعقادی بیشتر از 10 دقیقه در 37 درجه قرار نگیرد.
- پلاسمای لیپمیک و پلاسمای زرد رنگ و پلاسمای قرمز (نمونه همولیز) در دستگاه های کواگولومتر با روش نور سنجی باعث ایجاد خطا شده بنابراین لازم است با روش دستی انجام گردد .
- کمبود فیبرینوژن بین 80 تا100 میلی گرم درصد در تمام آزمایش های انعقادی که نقطه پایان آنها (End point) بر اساس تشکیل لخته است موجب طولانی شدن آن می شود.
- چنانچه از سیستم لوله های خلا برای نمونه گیری استفاده می گردد، نمونه مربوط به آزمایش های انعقادی باید ابتدا گرفته شود. چون احتمال آغشته شدن سوزن با محتویات لوله های دیگر مانند EDTA و یا ژل فعال کننده لخته وجود دارد.
- افزایش حجم نمونه تا میزان 10 درصد حجم واقعی می تواند قابل قبول باشد، به عنوان مثال برای حجم 2 میلی لیتر نمونه تا 0/2 افزایش نمونه (2/2 میلی لیتر) قابل قبول می باشد.

بخش بانک خون:

تعیین گروه خون وRh

همیشه گروه خون را خود چک کنید وثبت نمایید وبه گفته بیمار ونقل قول دیگران اعتماد نکنید . گروه خون و Rh را داخل لوله انجام دهید (با روش سل تایپ وبک تایپ). مزیت روش لوله ای : در آنمی های شدید ودر بیمارانی که مرتباً خون دریافت میکنند ویا بیماران دیالیزی ، بعلت تیتر پائین آگلوتینین ها ، با این روش جواب دقیق حاصل خواهد شد. بعد از تعیین گروه خون بیمار ، کیسه ویا کیسه های خون هم گروه (ISOGROUP) آنرا انتخاب نمائید . در صورت در خواست خون غیر هم گروه مثلاً برای تعویض خون حتماً مراتب را با پزشک معالج در میان گذاشته ومسئولیت اورا در این مورد کتباً بخواهید. پرسنل بانک خون طبق دستورالعمل بانک خون به روش زیر گروه خونی RH و ABO و cross match را انجام می دهند:

ABO type with Cell type

1. حداقل 5-2ml خون بیمار در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA با ذکر مشخصات ، تاریخ خون گیری، نام و نام خانوادگی بیمار و کد پذیرش گرفته می شود.
2. یک قطره Anti A به لوله 12*75 میلی لیتری تمیز اضافه می شود.
3. یک قطره Anti B به لوله 12*75 میلی لیتری تمیز اضافه می شود.
4. به هر یک از لوله ها یک قطره سوسپانسیون گلبول قرمز 5-2 درصدی بیمار اضافه می شود.
5. محتوی داخل لوله به مدت 23-15 ثانیه با دور g 1000-900 سانتریفوژ می شود.

6. نتایج واکنش درجه بندی و بررسی می شود.

ABO type with serum Back type

1. دو تا سه قطره از سرم یا پلاسما با ذکر مشخصات کامل را به دو لوله 75*12 میلی لیتری تمیز که قبلا با 1 و 2 نشانه گذاری شده میریزیم.
2. یک قطره سوسپانسیون گلبول A به لوله شماره 1 اضافه می کنیم.
3. یک قطره سوسپانسیون گلبول B به لوله شماره 2 اضافه می کنیم.
4. محتوی لوله را 30-15 ثانیه با دور g 1000-900 در سانتریفوژ قرار می دهیم.
5. نتایج واکنش درجه بندی و بررسی می شود.

روش عملکرد استاندارد آزمایش RH به روش لوله ای

1. مقدار 2- 5میلی لیتر خون در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA با درج نام و نام خانوادگی بیمار، کدپذیرش و تاریخ خون گیری می ریزیم.
2. یک یک قطره RH control را به لوله دوم که از قبل نشانه گذاری شده می ریزیم.
3. به هر یک از لوله ها یک قطره سوسپانسیون گلبول قرمز 5-2 درصدی اضافه می کنیم.
4. محتوای داخل لوله به مدت 30-15 ثانیه با دور 1000 – 900 سانتریفوژ می شود.
5. لوله را به آرامی تکان داده و نتیجه را بررسی می نماییم.
6. در صورتیکه واکنش $2^{+}\geq$ واکنش مثبت تلقی می شود.
7. آزمایش Ab اسکرینیگ در مرکز انتقال خون انجام می شود.
8. قطره Anti D به لوله که قبلا نشانه گذاری شده اضافه می شود.

روش تعیین گروه خون وRh به روش لوله ای

		به یک نسبت مساوی گلبول قرمز وآنتی سرم(سرم یا پلاسما) در لوله آزمایش انجام شود									
		نتایج		Back Type				Cell Type			
		گروه خون Rh	گروه خون	O Cell	B Cell	A Cell	سوسپانسیون RBC ٪5-4 مشخص	Anti D	Anti AB	Anti B	Anti A	آنتی سرم مشخص
		+	A	–	+	–	سرم یا پلاسمای اهداکننده	+	+	–	+	سوسپانسیون ٪7-5 RBC اهداکننده
		+	B	–	–	+		+	+	+	–	
		–	AB	–	–	–		–	+	+	+	
		+	O	–	+	+		+	–	–	–	

اگر سرم یا پلاسمای بیمار با O Cell واکنش داد از نظر O بمبئی و آلوآنتی بادی بررسی شود

به آرامی محتویات لوله را مخلوط کنید ، لوله ها را بمدت 15 الی 30 ثانیه با دور g 1000 یا (rpm3400) سروفیوژ شود ، چنانچه سروفیوژ نبود ، لوله ها را یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید . لوله ها را به آرامی در مقابل روشنایی تکان دهید تا میزان آگلوتیناسیون سلول ها قابل بررسی باشند . آگلوتیناسیون با هر گونه شدت یا همولیز نشان دهندۀ واکنش مثبت می باشد . در غیر این صورت واکنش منفی می باشد وجهت تایید آن زیر میکروسکوب بررسی گردد . نتایج سل تایب وبک تایپ حتماً باهم باید منطبق باشد ، در غیر اینصورت از مرکز انتقال خون راهنمایی لازم را کسب نمائید .

روی نمونه های Rh منفی نیز آزمایش Du گذاشته شود .

روش بررسی Rh منفی از نظر DU

یک لوله آزمایش

1. سوسپانسیون 2 تا 5 درصد از RBC بیمار : 3 قطره
2. آنتی سرم D : 3 قطره

3. 15 الی 30 دقیقه انکوباسیون در بن ماری 37 درجه سانتیگراد .

4. یک قطره آلبومین گاوی 22٪ از کناره دهانهٔ داخلی لوله اضافه شود .

5. 15 الی 30 دقیقه انکوباسیون در بن ماری 37 درجه سانتیگراد .

6. یک دقیقه سانتریفوژ با دور 1500 rpm

7. وجود آگلوتیناسیون دلیل مثبت بودن Rh است . در غیر اینصورت مراحل بعد را دنبال کنید

8. سه مرتبه شستشو با سرم فیزیولوژی

9. یک یا دو قطره آنتی هیومن به رسوب گلبولی حاصل اضافه نموده خوب مخلوط کنید

10. 45 ثانیه سروفیوژ شود .

11. عدم آگلوتیناسیون دلیل منفی بودن Rh ووجود آگلوتیناسیون دلیل مثبت بودن DU می باشد .

بیماران DU مثبت باید خونی که دریافت می نمایند حتماً Rh منفی باشد .

خون افراد DUمثبت برای بیماران Rh منفی مناسب نیست .

تست کراس مچ

1. نمونه بیمار را که ثبت مشخصات نام و نام خانوادگی ، کد پذیرش و تاریخ نمونه گیری بر روی لوله خون بیمار ثبت شده باشد را سانتریفوژ می کنیم.
2. به لوله شماره گذاری شده 2 قطره سرم بیمار+ 1 قطره سوسپانسیون گلبول قرمز 5-2 درصد اهدا کننده اضافه می کنیم و 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه می کنیم.
3. محتوی لوله را مخلوط و به مدت 30-15 ثانیه با دور 1000g سانترفوژ می کنیم.
4. در صورت عدم مشاهده همولیز یا اگلوتیناسیون 2 قطره آلبومین 22 درصد به لوله اضافه می کنیم.
5. لوله را به مدت 30-15 دقیقه در 37° قرار می دهیم.
6. لوله را سانتریفوژ و نتایج را بررسی می کنیم.
7. سپس لوله را 2 تا 3 بار با سرم فیزیولوژی 0.9 درصد شستشو و در مرحله آخر کاملا سرم فیزیولوژی را تخلیه می کنیم.
8. به لوله دو قطره AHG اضافه و لوله را مخلوط و سانتریفوژ و نتیجه را بررسی می نماییم.
9. در صورت عدم وجود هرگونه واکنش ، کراس مچ منفی و نمونه خون اهدا کننده با خون بیمار سازگار گزارش می شود.

بخش سرولوژی:

دستورالعمل نحوه انجام آزمایشات سرولوژی :

آزمایش CRP:

C Reactive protein پروتئینی که درمرحله حاد بیماری ها ظاهرمی شود. این پروتیین درسرم و مایعات بدن افرادسالم به مقدارکم گزارش شده .مقدارCRP درعفونت های باکتریایی و سکته قلبی حاد، سرطان های بدخیم ،آرتریت روماتویید فعال عفونت های ویروسی سل وتب روماتیسمی افزایش پیدامیکند. اهمیت آن ازنظرتشخیصی بلکه ازنظرشدت بیماری و واکنش نسبت به درمان اهمیت دارد زیرا بلافاصله پس ازدرمان وبرداشت تومورسرطانی قبل ازطبیعی شدن ESR کاهش می یابد.

تفاوت ESR وCRP :

CRP سریع افزایش و سریع کاهش می یابد ESR دیربالاو دیر پایین می آید.

بهتر است آزمایش با سرم تازه بیمارانجام گردد درغیراینصورت از نمونه ای که حداکثر72ساعت دریخچال بوده می توان استفاده کرد.درابتدای بازکردن کیت همیشه بایدیک سرم کنترل مثبت و منفی برای لاتکس انجام داد.

روش آزمایش وگزارش دادن جواب :

یک قطره سرم بیمار(50لاندا) + یک قطره CRP LATEX روی اسلاید تیره (مشکی) به مدت 2 دقیقه روی روتاتورگذاشته و درآخراز نظر آگلوتیناسیون بررسی و به صورت + 1،+ 2، +3 و یا منفی گزارش میشود.

آزمایش RF و RA :

اتوانتی بادیهای Igm برعلیه IgG FC درسرم ظاهرمی شوند فاکتور روماتویید درسرم یا در مایع مفصلی متداول ترین و ساده ترین تست جهت افتراق آرتریت روماتویید از سایربیماریهای التهابی مزمن است آنتی ژن شامل IgG انسانی است که به ذرات لاتکس چسبیده.

روش آزمایش وگزارش دادن جواب :

یک قطره سرم بیمار + یک قطره RF Latex روی اسلاید تیره (مشکی) به مدت 2 دقیقه روی روتاتورگذاشته و درآخراز نظر آگلوتیناسیون بررسی و به صورت + 1،+ 2، +3 و یا منفی گزارش میشود.

آزمایش ASO (Anti streptolysin o test)

ازعوارض مهم عفونت های استرپتوکوکی گروه A تب روماتیسمی وگلومرولونفریت حاد می باشد حدود3 ٪ عفونتهای استرپتوکوکی گلو منجربه تب رماتیسمی می شوند.آزمایش ASO برای تشخیص آنتی بادی برضدترشحات یا آنتی ژن های استرپتوکک درسرم انجام می گردد.

روش آزمایش وگزارش جواب:

آزمایش ASO بر روی سرم بیمارانجام میگیرد

یک قطره سرم+ یک قطره آنتی ژن روی اسلاید تیره (مشکی) به مدت 2 دقیقه روی روتاتورگذاشته و درآخراز نظر آگلوتیناسیون بررسی می کنیم .و در صورت مثبت بودن اگلوتیناسیون جهت انجام ازمایش کمی ارجاع داده میشود.

آزمایش Wright :

بروسلا عامل بروسلوز یا تب مالت «تب مواج » می باشد . انسان از طریق خوردن شیرآلوده و پنیر.آلوده و ..... مبتلا می شود.

روش اسلایدی Wright (رایت سریع):

رزبنگال :آنتی ژن قرمز متمایل به صورتی است که بایددور از نور دریخچال نگهداری شود.

یک قطره سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن روی اسلاید ریخته ظرف 2 - 4 دقیقه از نظرآگلوتیناسیون بررسی کرده و نتیجه فقط به صورت + یا – گزارش می شود .نباید آنتی ژن را رقیق کرد چون تعداد ذرات میکروبی وPH آن تغییرمی کند.

روش سریع به صورت زیرانجام می شود:

50 لاندا آنتی ژن رایت روش سریع + 50 لاندا سرم بیمار

50لاندا آنتی ژن رایت روش سریع + 20 لاندا سرم بیمار

نکته : اگر رایت سریع مثبت شد باید آزمایش Wright لوله ای انجام شود.

آزمایش Wright لوله ای:

6 لوله انتخاب کرده درلوله اول 900 لاندا در لوله های بعدی 500 لاندا سرم فیزیولوژی میریزیم .

درلوله 1: 100لاندا سرم بیمار +900 لاندا سرم فیزیولوژی پس ازمخلوط کردن 500 لاندا آن را به لوله 2 منتقل می کنیم همینطور تا لوله 6 ادامه می دهیم ازلوله 6 500لاندا بیرون میریزیم به هرکدام از لوله ها500 لاندا آنتی ژن رایت لوله

اضافه میکنیم و درآخر درب تمام لوله ها ر ا با پارافین بسته وبعد از مخلوط نمودن به مدت 24 ساعت در انکوباتور دمای 37 درجه

سانتی گراد میگذاریم . سپس لوله ها را حدود پنج دقیقه با دور2000 سانتریفوژ نموده و از نظرآگلوتیناسیون بررسی می کنیم.

درصورت مثبت بودن درهرلوله باید بر اساس جدول زیر تیترگزارش می شود :

شماره لوله	1	2	3	4	5	6
رقت	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640

آزمایش Coombs Wright :

برای تشخیص آنتی بادیهای ناقص خصوصا در موارد بروسلوزمزمن بکار می رود.

روش آزمایش Coombs Wright و گزارش دادن جواب:

ابتدا تمام مراحل آزمایش Wright لوله ای انجام و در صورت منفی بودن لوله ها راسه مرتبه باسرم فیزیولوژی شستشو می دهیم سپس لوله ها را کاملا خالی و به ته نشین لوله ها یک قطره آنتی هیومن AHG اضافه میکنیم لوله هارا 1- 0/5 ساعت در بن ماری 37 درجه گذاشته مجددا سانتریفوژ نموده و از نظر آگلوتیناسیون بررسی میکنیم و جواب مانندآزمایش Wright

لوله ای به صورت تیتر گزارش میشود.

آزمایش 2ME:

پس از مثبت شدن آزمایش رایت در صورت درخواست پزشک انجام می شود تا نوع آنتی بادی و فاز بیماری

(حاد یا مزمن) مشخص گردد با این آزمایش مولکول های IgM ازبین میرود ولی IgG باقی میماند.

2ME باندهای دی سولفیدی را می شکند. ارزش این آزمایش درافتراق بروسلوز فعال ازغیرفعال می باشد. روش آزمایش همانند Wright لوله است به جراینکه به جای سرم فیزیولوژی از بافر2ME استفاده می شود. ولوله اول که شامل سرم بیمار و بافر است یک ساعت در بن ماری 37 درجه می ماند و سپس رقت سریالی تهیه میشود. تمام مراحل آزمایش وگزارش کردن تیتر جواب مانندWright لوله انجام میشود.

آزمایش ویدال Widal test :

برای تشخیص بیماری حصبه و شبه حصبه می باشد عامل آن باسیل سالمونلا می باشد سه انتی ژن Vi،H،O داردکه وجود آنتی بادی برعلیه آنتی ژن O در سرم بیمار از نظرکلینیکی ارزش دارد جنس آنتی ژن O ازنوع IgM می باشد درحالیکه

آنتی ژن H از نوع IgG می باشد پس ازدرمان حصبه ظرف 3 تا6 ماه آنتی O منفی میشود ولی آنتی H تامدت ها باقی

می ماند و در موارد اپیدمی اهمیت دارد. سروتیپ های انتی ژن O شامل OD, OB , OA می باشد.

روش آزمایش ویدال و گزارش دادن جواب:

OA آنتی بادی (روی اسلاید) + یک قطره سرم بیمار(50لاندا)

OB آنتی بادی (روی اسلاید) + یک قطره سرم بیمار(50لاندا)

OD آنتی بادی (روی اسلاید) + یک قطره سرم بیمار (50لاندا)

سپس مخلوط به مدت 3 دقیقه حرکت داده ازنظرآگلوتیناسیون بررسی میکنیم.

درصورت مثبت بودن هرکدام باید تیتر شود مثلا OD مثبت میشود.

1/40 50لاندا سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن OD

1/80 20 لاندا سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن OD

1/160 10 لاندا سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن 1/320 5 لاندا سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن OD جهت انجام آزمایش ویدال به روش لوله همانند رایت لوله عمل میکنیم .آنتی ژن بایستی طبق دستورسازنده رقیق واستفاده گردند.

آزمایش RPR و VDRL :

هردو تست به عنوان تست های غربالی در افراد مشکوک به سیفلیس جهت بررسی آنتی بادی های غیر اختصاصی راژین انجام می شوند. که این آنتی بادی ها ازجنس IgM و IgG است مزیت RPR نسبت به VDRL این است که نیازی به غیرفعال کردن کمپلمان نیست.

درازمایش RPR یک قطره سرم بیمار+ یک قطره آنتی ژن (روی اسلاید سفید رنگ) مخلوط نموده حداکثرظرف 4 دقیقه بررسی می کنیم .در صورت ایجاد واکنش فلوکولاسیون نتیجه را به صورت مشکوک گزارش می کنیم. و در کامنت جواب جهت تایید تست های تخصصی مانند FTA abs توصیه میشود.

آزمایش کومبس مستقیم Direct coombs :

برای بررسی گلبول های حساس از این آزمایش استفاده می شود نمونه مورد نظرخون حاوی ضدانعقاد(EDTA) می باشد.خون موردنظر را 3 مرتبه با سرم فیزیولوژی شسته ،سوسپانسیون2- ٪5 تهیه کرده به یک قطره آن یک قطره آنتی هیومن افزوده به مدت 2 دقیقه در 1500 سانتریفوژ نموده از نظرآگلوتیناسیون در برابر نور بررسی میکنیم گزارش بصورت منفی و یا مثبت می باشد و این تست در نوزادان حساس (مادرRH منفی) و بیماران (اتوایمیون) استفاده می شود.

آزمایش کومبس غیرمستقیم Indirect coombs :

برای جستجوی آنتی بادی درسرم بیماران استفاده می شود سوسپانسیون O ٪2-5 موردنیاز است که بعد از3 بارشستشوی O Cell با سرم فیزیولوژی تهیه می شود.

دو قطره سرم بیمار را به دو قطره سلول O ٪2-5 اضلفه نموده لوله را به مدت 0.5 تا 1 ساعت در37 درجه سانتی گراد قرار می دهیم سپس3 مرتبه با سرم فیزیولوژی شسته تا آنتی بادی های اضافی حذف گردند لوله راخشک نموده یک قطره آنتی هیومن اضافه کرده 0.5 ساعت در37 درجه سانتی گراد قرار داده به مدت 2 دقیقه در دور 1500 سانتریفوژ کرده از نظر آگلوتیناسیون بررسی می کنیم و گزارش بصورت منفی و مثبت میباشد.

بخش میکروب شناسی:

محیط های کشت میکروبی:

1- جامد
2- مایع
3- دوفازی

طبقه بندی محیط ها و عملکرد آنها:

1- **محیط غنی شده:** دارای مواد مغذی اختصاصی مورد نیاز برای برخی پاتوژن های خاص جهت تشدید رشد آنها در مخلوطی از میکروارگانیسم ها
2- **محیط های غیرانتخابی (حمایتی):** برای رشد اکثر ارگانیسم های غیرمشکل پسند است بدون آن که امتیاز رشدی را به هیچ ارگانیسم خاصی بدهد. مانند محیط blood agar
3- **محیط انتخابی:** حاوی مواد مهار کننده است که جلوی رشد اکثر میکروارگانیسم ها را می گیرد و تعداد مشخصی در آن رشد می کند. عوامل مهار کننده رشد شامل اسید، رنگ ها، الکل، نمک های صفراوی و آنتی بیوتیک ها است.
4- **محیط افتراقی**: فاکتورهایی دارد که به یک گونه از یک باکتری این امتیاز را می دهد که از گونه های دیگر باکتری متمایز شود. مثل محیط مکان کی

محیط های کشت روتین مورد استفاده:

1- **BHI (Brain-Heart-Infusion):** محیط غنی شده است که به تعداد زیادی از باکتری ها اجازه رشد می دهد.
2- **Chocolate agar:** مانند بلاد آگار است، ولی به علت اینکه در هنگام تهیه، گلبول های قرمز لیز می شود و مواد مغذی داخل سلولی (مانند hemin و فاکتور 5 و 10 انعقادی) اضافه می شود، پاتوژن هایی مانند نایسریا گنوره آ و هموفیلوس در آن رشد دارند، در حالی که قادر به رشد در بلاد آگار نیستند.
3- **مکان کی:** شایع ترین محیط افتراقی و انتخابی است. مهارگر آن کریستال ویوله و نمک صفراوی برای مهار گرم مثبت ها و قارچ هاست یعنی آن دسته از باکتری های گرم منفی که لاکتوز را تخمیر می کنند با تولید اسید سبب کاهش PH و تغییر رنگ محیط شده و کلنی ظاهر قرمز-صورتی پیدا می کند و گرم منفی هایی که non ferment هستند (مثل شیگلا) کلنی بی رنگ و شفاف ایجاد می کنند.
4- **XLD agar:** محیط افتراقی و انتخابی است که برای شیگلا و سالمونلا مناسب است. پاتوژن های روده ای شیگلا کربوهیدرات های محیط (گزیلوز، لاکتوز و سوکروز) را تغییر نداده و کلنی بی رنگ (هم رنگ محیط) یعنی صورتی-قرمز ایجاد می کنند و انواع تخمیر کننده (غیر پاتوژن) یکی یا بیشتر از این قندها را تخمیر کرده و رنگ کلنی زرد می شود.
5- **تایو گلیکولات:** محیط غنی شده ای است که حاوی کازئین و مواد استخراجی از مخمر، beef، ویتامین، دکستروز، hemin و ویتامین K1 می باشد. در قسمت ته لوله محیط جهت رشد بی هوازی ها مناسب است. باسیل های گرم منفی بی هوازی اختیاری به صورت منتشر رشد می کنند. کوکسی های گرم مثبت به صورت puffbull و باکتری های هوازی مثل سودوموناس در سطح محیط رشد می کنند.
6- **EMB (Eosin Methylene Blue):** این محیط افتراقی و انتخابی است و مهارگر آن ائوزین و متیلن بلو است.

تست های تک آنزیمی بر اساس توانایی های باکتریایی:

1- **تست کاتالاز:** روش انجام این تست: مقدار کمی از کلنی باکتری را روی یک سطحی از لام تمیز قرار داده و یک قطره H2O2 3% را روی کلنی می ریزیم. در صورتی که ایجاد حباب کرد کاتالاز مثبت است.

نکته: در هنگام انجام تست کاتالاز نباید RBC از محیط (مثلا بلاد آگار) برداشته شود. زیرا ممکن است مقداری حباب ایجاد شده و سبب شود تست به صورت مثبت کاذب گزارش شود.

2- **تست اکسیداز:** این تست به صورت دیسک است. از کلنی باکتری برداشته و دیسک را آغشته به کلنی میکنیم. در صورتی که در کمتر از 5 دقیقه تغییر رنگ آبی مشاهده شود تست مثبت است.

3- **تست ایندول:** با کمک معرف کواکس و با استفاده از محیط SIM بررسی می شود.

4- **تست کواگولاز:** این تست با استفاده از پلاسمای خرگوش و به دو روش اسلایدی و لوله ای گزاشته می شود. در روش اسلایدی (برای بررسی کواگلاز اتصالی) مقداری از کلنی را درون آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآورده و سپس مقداری پلاسمای خرگوش به آن اضافه می کنیم. لام را به مدت 5 تا 10 ثانیه به آرامی تکان داده که در صورت مشاهده آگلوتیناسیون تست مثبت است. در روش لوله ای (برای بررسی کواگلاز آزاد) سوسپانسیونی از کلنی تهیه کرده و سپس به نسبت 1 به 4 از پلاسمای خرگوش، سوسپانسیون را داخل لوله استریل می ریزیم و به مدت 4 ساعت داخل 37 درجه انکوبه می کنیم. سپس از این مدت به بعد زمان آگلوتیناسیون را بررسی می کنیم. در صورت عدم آگلوتیناسیون نمونه را به مدت 4 ساعت در دمای محیط نگه میداریم که در صورت مشاهده کلامپ نتیجه مثیت است.

5- **هیدرولیز DNA:** جهت بررسی حضور DNase در باکتری می باشد. چنانچه باکتری DNA محیط را هیدرولیز کند اطراف خط کشت پس از تلقیح HCL یک نرمال هاله شفاف ایجاد می کند.

6- **LIA (Lysine Iron Agar) :** محیط به رنگ بنفش می باشد. نتایج تست:

الف) K/K: نشانه دکربوکسیله شدن لیزین و عدم تخمیر گلوکز می باشد.

ب) K/A: تنها تخمیر گلوکز صورت گرفته و تولید H2S که سیاه شدن محیط (هم در محیط K/K و هم در محیط K/A) مشاهده می شود.

ج) R/A: د آمینه شدن لیزین و تخمیر گلوکز در این حالت اتفاق می افتد.

مثال ها: K/K و H2S مثبت: سالمونلا تی فی- K/A: شیگلا فلکسنری- R/A: پروتئوس ولگاریس

7- **تست MR/VP(Methyl Red and Voges-Proskauer):** هر دوی این محیط ها از یک باز تشکیل شده اند و فقط معرف هایی که پس از تلقیح و انکوبه به آن ها می افزاییم متفاوتند. برای تست VP از دو معرف آلفا نفتول و KOH استفاده می شود که به نسبت 3به1 روی محیط اضافه می گردد و پس از مدت زمان 15 دقیقه پس از افزودن معرف ها در صورت تولید رنگ قرمز VP مثبت است. برای تست MR معرف متیل رد به ازای 2.5 سی سی محیط 2 الی 3 قطره می افزاییم که در صورت تولید رنگ قرمز نتیجه تست مثبت است.

8- **تست حرکت (Motility):** این تست به دو حالت انجام می شود:

الف) حالت اول یا حالت Hanging drop: از کشت تازه نمونه بر روی یک لام سوسپانسیون کوچکی تهیه کرده و سپس با ایجاد فضای بین لام و لامل، لامل را روی قزه قرار می دهیم و در ادامه آن را با لنز 40 مورد بررسی قرار می دهیم. در صورتی که تغییر موقعیت در باکتری ملاحظه شود حرکت مثبت است.

ب) به کمک محیط نیمه جامد SIM: در صورتی که باکتری باکتری اطراف خط کشت تلفیقی رشد کرد و داخل محیط پخش شد حرکت باکتری مثبت است.

9- **تست ONPG یا ortho-Nitrophenyl-β-galactoside:** برای این تست سوسپانسیونی از باکتری داخل لوله تهیه می کنیم و سپس دیسک ONPG را داخل آن می اندازیم و پس از انکوباسیون در دمای 37 درجه در صورت تغییر رنگ به زرد نتیجه مثبت است.

10- **تست مصرف سیترات (سیمون سیترات آگار):** جهت تعیین توانایی باکتری در مصرف سیترات سدیم به عنوان منبع کربن به کار می رود. اندیکاتور برم تیمول بلو که با رشد باکتری تغییر رنگ سبز به آبی ایجاد می شود.

نکته: رشد باکتری با یا بدون تغییر رنگ محیط مثبت تلقی می شود.

11- **تست TSI:** این تست به سه حالت انجام می شود:

الف) A/A: در این حالت قسمت بالا و پایین محیط هر دو زرد رنگ می شود و باکتری هر سه قند موجود در محیط را مصرف می کند که می تواند بدون H2S باشد و در برخی باکتری ها همراه با تولید H2S می باشد. بسته به نوع باکتری ها تولید گاز هم در این محیط بررسی می شود.
ب) A/K/A: در این حالت قسمت بالای محیط قرمز رنگ بوده که همراه با رشد باکتری است و قسمت پایین محیط زرد رنگ است.
ج) A/K/A/K: در این حالت هیچ گونه قندی در این محیط مصرف نشده است.

12- تست اوره آز: در این محیط پس از تلقیح باکتری و انکوباسیون 24 ساعته در 37 درجه، در صورتی که رنگ محیط به صورتی رنگ تغییر کند اوره آز مثبت است.

13- تست های اکسیداسیون و تخمیر: مصرف کربوهیدرات ها و مواد پروتئینی بررسی می شود. پروسه اکسیداتیو برخلاف تخمیر نیاز به اکسیژن دارد. باکتری مورد بررسی به داخل دو لوله F و O حاوی گلوکز تلقیح می شود. روی محیط F را با روغن معدنی به عنوان ممانعت کننده عبور اکسیژن می پوشانیم. با تولید اسید به عنوان محصول نهایی استفاده از گلوکز تغییر PH رخ داده و بر اساس اندیکاتور PH محیط، تغییر رنگ صورت می گیرد. مثلا اگر اندیکاتور محیط برم تیمول بلو باشد تغییر رنگ از سبز به زرد صورت می گیرد.
نتیجه: چنانچه اسید تنها در لوله هوازی تولید شود به ارگانیسم Glucose Oxidizer می گویند مانند سودوموناس آلکالیژنز. ولی اگر در هر دو لوله تهییه شود به میکروارگانیسم Glucose Fermenter می گویند مانند انتروباکترها

کشت ادرار

این آزمایش برای تشخیص عفونت مجرای ادراری در مبتلایان به دیزوری، تکرار و اضطرار در دفع ادرار مورد استفاده قرار می گیرد. در زنان و مردان عفونت مجرای ادراری ممکن است بدون علامت، حاد و یا مزمن باشد. عامل عفونت در بیشتر موارد باسیل های روده ای به ویژهE.coli ، گونه های پروتئوس و انتروکوک ها می باشد. در ده درصد عفونت ها ممکن است دو باکتری عامل عفونت باشند. وجود بیش از سه نوع باکتری در کشت نشانگر عدم جمع آوری صحیح نمونه و آلودگی است.

نمونه گیری

- برای انجام کشت ادرار نمونه ادرار صبحگاهی بهتر است.
- نمونه ادرار باید در ظرف دهانه گشاد استریل جمع آوری شود.
- قبل از انجام نمونه گیری منفذ ادراری باید با آب و صابون شسته شود و بعد از آبکشی قسمت اول ادرار دور ریخته شود و قسمت میانی ادرار در ظرف مخصوص جمع آوری گردد.
- نمونه ادرار در عرض دو ساعت باید کشت داده شود. در صورت عدم امکان کشت نمونه می تواند تا ۱۸ ساعت در یخچال نگهداری شود.
- در صورتی که نمونه ادرار در منزل تهیه شود باید سریع (ظرف ۳۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل شود.
- آلودگی نمونه با مدفوع، ترشحات واژن، دست ها یا البسه موجب نتایج مثبت کاذب می شود.
- مصرف آنتی بیوتیک بر نتیجه آزمایش تاثیر می گذارد.

روش انجام:

- از لوپ کالیبره شده برای کشت ادرار استفاده می شود.
- لوپ را به طور عمودی در ظرف ادرار فرو برده و به صورت یک خط در وسط محیط بلاد آگار و مکانکی کشت داده و سپس آن را پخش نمایید. پس از کشت ادرار محیط‌ها را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه کنید.
- سپس کلنی‌های ظاهر شده برروی هر کدام از پلیت‌ها را شمارش و در ضریب حجم لوپ ضرب نمایید.

- کشت ها را پس از ۲۴ ساعت بررسی کنید در صورتی که رشد واضحی دیده نمی شود و یا رشد برای شناسایی خیلی جوان است به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه نمایید.
- در صورتی که تعداد لکوسیت های ادرار بیش از سه عدد در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۴۰۰ باشد کلونی ها به هر تعدادی که باشد باید تعیین هویت و آنتی بیوگرام انجام شود.
- در ادرار خانم ها و آقایان با تعداد کلونی بین ۱۰ تا ۱۰۰ هزار آزمایش باید تکرار گردد و در صورتی که تعداد کلونی دوباره به همین صورت بود، آنتی بیوگرام انجام شود.
- در آقایان تعداد ۱۰۰ هزار کلونی حتی در صورت پایین بودن تعداد لکوسیت آنتی بیوگرام شوند و در خانم ها پس از تکرار آزمایش آنتی بیوگرام انجام شود.
- اگر کشت ادرار مثبت بوده اما نمونه فاقد لکوسیت باشد در این صورت کشت فاقد اعتبار می‌باشد. (احتمال آلودگی با مدفوع).
- در صورتی که نمونه ادرار با سرنگ بطور مستقیم از مثانه آسپیره شده باشد، تعداد کلونی ها هر چه باشد آنتی بیوگرام انجام شود.

کشت مدفوع

کشت مدفوع برای بیماران دچار اسهال شدید، تب و نفخ شکمی درخواست می شود. به طور طبیعی مدفوع حاوی باکتری و قارچ زیادی می باشد. ولی باکتری های نظیر سالمونلا، شیگلا، کمپیلوباکتر، یرسینیا، اشریشیاکلی و استافیلوکوک پاتوژن برای روده بیماریزا هستند.

نمونه گیری:

- در هنگام نمونه گیری و انتقال مدفوع از دستکش استفاده نمایید.
- برای جمع آوری نمونه از ظرف مناسب استفاده کنید.
- نمونه ی مدفوع را بلافاصله به آزمایشگاه انتقال دهید.
- ادرار می تواند مانع از رشد باکتری ها شود. به همین دلیل نباید نمونه مدفوع با ادرار مخلوط شود.

روش انجام:

- حداکثر ۲ ساعت پس از دریافت نمونه مدفوع توسط آزمایشگاه، نمونه باید مورد آزمایش و کشت قرار گیرد.
- در صورت ماندن بیش از حد نمونه و سرد شدن آن PH کاهش یافته و در نتیجه مانع از رشد بسیاری از انواع شیگلا و سالمونلا در محیط کشت می شود.
- هنگامی که نمی توان نمونه مدفوع را سریع مورد بررسی و آزمایش قرار داد آن را باید به محیط ترانسپورت انتقال داد.
- برای جداسازی باکتری های بیماریزای روده ای از محیط های انتخابی و افتراقی مناسب استفاده شود.
- بعد از انکوباسیون میزان رشد، رنگ و شکل کلونی ها بررسی و ثبت گردد.

کشت خون

هنگامی که سرعت تکثیر باکتری ها به حدی برسد که سیستم رتیکولواندوتلیال نتواند آن ها را از بدن حذف کند باکتریمی ایجاد می شود. با کتری ها به طور عمده از مناطق خارج عروقی و از طریق عروق لنفاتیک وارد خون می شوند. به طور طبیعی ماکروفاژهای ثابت کبد و طحال بعد از چند دقیقه تا چند ساعت باکتری ها را از جریان خون حذف می کنند و لی گاهی تعداد باکتری ها از حد توانایی سیستم فراتر می رود و سپتی سمی رخ می دهد. کشت خون می تواند در درمان این عفونت های کشنده کمک کننده باشد.

نمونه گیری:

- خونگیری از بیمار حتی المقدور قبل از تجویز داروهای آنتی بیوتیک انجام گیرد و بهترین زمان خونگیری زمانی است که بیمار علائم تب و لرز را نشان می دهد.
- بهتر است ۲ تا ۳ نمونه خون به فاصله یک ساعت از بیمار گرفته و کشت داده شود.
- محیط های کشت خون تهیه شده باید بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در انکوباتور (۳۷ درجه) قرار داده شود.
- ضدعفونی کردن محل خونگیری، رعایت کامل شرایط استریل در موقع خون گیری ، تلقیح مستقیم خون به داخل بطری کشت خون ، می تواند تا حد زیادی از آلوده شدن کشت های خون جلوگیری نماید . هر چند با رعایت اینن موازین و در بهترین شرایط کاری ، حدود ۳ تا ۵ درصد کشت های خون در معرض آلودگی قرار می گیرند کهه این آلودگی می تواند منشا پوستی یا محیطی داشته باشد.

روش انجام:

- محیط کشت خون بصورت مایع و در ویال های شیشه ای پلمپ شده موجود می باشد. این محیط کشت حاوی ضد انعقاد (سدیم پلی آنتول سولفونات) جهت جلوگیری از لخته شدن می باشد.
- برای انجام کشت ابتدا باید درپوش بطری‌های کشت خون را قبل از ترزیق خون ضد عفونی کرد. سپس خون را به درون بطری تزریق کرده و بطری‌های کشت خون را به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه قرار داد.
- بطری کشت خون باید به طور مرتب بررسی شود. کشت استریل معمولا به صورت لایه‌ای از گلبولهای قرمز که به وسیله محیط کشت شفاف پوشانده شده است مشخص می‌گردد.
- علائم رشد میکروب در محیط کشت خون به شرح زیر است:
- رسوب فولیکولار در سطح گلبولهای قرمزکدورت یکنواخت یا کدورتی که در زیر سطح مایع کشت خون دیده می‌شود.همولیزانعقاد محیط کشتایجاد پوسته نازک در سطحتولید گازدانه‌های سفید در سطح یا عمق گلبولهای قرمز
- هرگاه رشد باکتری در بطری مشهود باشد باید بوسیله سرنگ از بطری آسپیره نموده و رنگ آمیزی گرم و پاساژ بر روی محیط های مناسب انجام پذیرد.

- در موارد عادی کشت خون را تا ۷ روز نگهداری می‌کنند اما در موارد مشکوک به بروسلوز یا سایر میکروب‌های سخت رشد، اندو کاردیت و یا مصرف آنتی بیوتیک محیط کشت را باید بیشتر نگهداری نمود (۳ هفته) پس از مدت زمان فوق محیط‌های کشت را از نظر رشد کلنی‌ها مورد بررسی قرار می‌دهیم.
- بعضی باکتری ها بدون ایجاد کدورت رشد می کنند لذا پس از ۲۴ ساعت و بعد از ۷ روز حتی بدون دیدن کدورت هم ساب کالچر انجام می شود.
- از آنجایی که گزارش سریع نتیجه کشت خون می‌تواند سر نوشت ساز باشد لذا هر نتیجه‌ای را در هر مرحله باید بلافاصله به اطلاع پزشک معالج رساند.

کشت خلط

کشت خلط برای تعیین وجود باکتری بیماری زا در مبتلایان به عفونت های تنفسی مانند پنومونی انجام می شود.

نمونه گیری:

1. بهترین نمونه برای انجام آزمایش نمونه صبحگاهی است.
2. نمونه خلط برای انجام کشت باید قبل از شروع درمان ضد میکروبی جمع آوری شود.
3. نمونه تهیه شده را در ظرف مخصوص دهان گشاد ریخته و در دمای یخچال نگهداری شود و در اسرع وقت به آزمایشگاه ارسال گردد. ماندن بیش از حد نمونه خلط در خارج از آزمایشگاه در جواب آزمایش تاثیر می گذارد.
4. در تمام مراحل گرفتن نمونه باید از دستکش یکبار مصرف استفاده شود.

روش انجام:

- رنگ آمیزی گرم اولین مرحله آنالیز میکروب شناسی خلط می باشد. با رنگ آمیزی گرم باکتری ها به دو گروه گرم مثبت و منفی تقسیم می شوند.این روش ممکن است تا زمان کامل شدن آزمایش کشت برای تعیین درمان دارویی استفاده شود.
- پس از کشت نمونه خلط روی محیط های مناسب و طی زمان انکوباسیون، آنتی بیوگرام به منظور شناسایی مناسب ترین درمان دارویی ضد میکروبی انجام می شود.
- تکمیل آزمایش کشت حداقل به ۴۸ ساعت وقت نیاز دارد. ممکن است کشت خلط از نظر قارچ و مایکو باکتریوم توبرکلوزیس ۶-۱۰ هفته به طول انجامد.

کشت زخم

کشت زخم برای تشخیص وجود عوامل بیماریزا در بیماران مشکوک به عفونت زخم انجام می شود. عفونت های زخم اغلب بوسیله ارگانیسم های چرکزا بوجود می آیند، که ممکن است باکتریایی، قارچی یا انگلی باشند.

نمونه گیری:

- قبل از نمونه برداری کلیه وسایل لازم را آماده نمایید. وسایل باید استریل یا یکبار مصرف باشند.
- همه کشت ها را باید قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی انجام داد.
- جهت نمونه گیری زخم های سطحی سطح خارجی نمونه را با پنبه و الکل ٪۷۰ درصد تمیز کرده، چرک را از زخم آسپیره نموده یا با برش آن را جدا نمایید. سپس نمونه را به لوله درپوش دار استریل انتقال دهید.
- جهت نمونه گیری با سواپ، ابتدا یک سواپ پنبه ای استریل را به صورت آسپتیک وارد زخم نمایید. سپس سواپ را در یک لوله آزمایش درپوش دار استریل قرار دهید.(کشت نمونه از لبه های پوست در مقایسه با کشت ترشحات چرکی از دقت کمتری برخوردار است.(
- در مورد نمونه گیری از بافت های نرم و زخم های عمیق باید سطح زخم را با الکل ٪۷۰ و سپس با تنتورید ٪۲ ضدعفونی نمود. سپس با آسپیراسیون از عمیق ترین قسمت ضایعه یا با عبور سواب به عمق ضایعه و یا از لبه ضایعه نمونه برداری را انجام داده و سپس نمونه را به لوله درپوش دار استریل انتقال دهید.
- در صورت مشکوک بودن به وجود ارگانیسمی بی هوازی، یک لوله کشت بی هوازی نیز در نظر گرفته شود. بهترین روش نمونه گیری، آسپیراسیون از زخم بسته و انتقال مستقیم چرک به درون لوله کشت بی هوازی میی باشد.
- اگر کشت زخم باید از بیماری گرفته شود که نیاز به شستشوی زخم دارد، نمونه گیری را قبل از شستن زخم انجام دهید.
- اگر قبل از انجام نمونه گیری جهت کشت، پماد یا محلول آنتی بیوتیک روی زخم مالیده شده است آن را با آب یا سالین استریل از روی زخم پاک نمایید.
- همه نمونه ها را به دقت حمل کنید. این نمونه ها ممکن است قادر به انتقال بیماری باشند.
- نمونه را بلافاصله به آزمایشگاه انتقال دهید.
- توجه شود اگر چرک در زخم یا بافت نرم مشاهده شد، بلافاصله باید بیمار تحت احتیاط های ایزوله نمودن پوست و زخم قرار گیرد. برای شروع احتیاط های محافظتی مناسب نیازی به گزارش کشت تایید کننده عفونت نیست.

روش انجام:

- نمونه های کشت زخم اغلب بصورت سواپ در داخل لوله های استریل حاوی سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه ارسال می گردد . سواپ آغشته به نمونه بیمار را کنار شعله، از لوله خارج نموده و روی محیط های مناسب کشت داده شود.
- در صورت درخواست اسمیر باید یک سواپ جداگانه به آزمایشگاه ارسال شود ، اگرنمونه ارسالی در داخل لوله بدون سواپ بود می توان از یک سواپ استریل برای برداشت نمونه استفاده کرد.

- انجام رنگ آمیزی گرم برای لام حاوی گستره نمونه، در مواقعی که پزشک می خواهد درمان آنتی بیوتیکی را قبل از آماده شدن نتیجه کشت شروع کند، بسیار مفید است. در چنین مواقعی پزشک براساس تجربه گذشته در مورد تشخیص احتمالی عامل بیماریزا، آنتی بیوتیک را آغاز می نماید.
- پس از کشت نمونه زخم روی محیط های مناسب و طی زمان انکوباسیون، آنتی بیوگرام به منظور شناسایی مناسب ترین درمان دارویی ضد میکروبی انجام می شود.
- بسیاری از عفونت های زخم حاوی بیش از یک نوع ارگانیسم هستند.
- اغلب ارگانیسم ها نیاز به زمانی حدود ۲۴ ساعت دارند تا در محیط کشت رشد کنند و گزارش مقدماتی پس از این مدت آماده می شود. گاهی ۴۸ تا ۷۲ ساعت زمان برای رشد و تشخیص ارگانیسم مورد نیاز می باشد.

وظایف بخش میکروب شناسی

- دارای برنامه‌ی کنترل کیفی براساس الزامات مرجع سلامت
- تحویل گرفتن نمونه ها از واحد نمونه گیری و نگهداری نمونه ها در شرایط مناسب حرارت طبق استانداردهای موجود در هر آزمایش
- بررسی نمونه ها از نظر مقدار و عوامل مداخله گر قبل از انجام آزمایش
- عودت نمونه های نامناسب جهت تکرار نمونه گیری و تکرار آزمایشات در صورت مشاهده موارد مشکوک
- انجام کنترل کیفی دستگاه ها، محیط های کشت، دیسک های آنتی بیوگرام ،معرف های مورد استفاده
- انجام کشت های میکروبی و خواندن و تفسیر آن ها بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت
- خواندن کشت های خون و تفسیر آن ها بعد از ۲۴، ۴۸ساعت و ۳ هفته و یک ماه
- تشخیص و تعیین انواع باکتری ها در نمونه های میکروب شناسی از طریق استفاده از محیط های کشت افتراقی و آنتی سرم های مربوطه
- تهیه و نگهداری صحیح محیط های کشت روتین، اختصاصی و افتراقی جهت شناسایی باکتری ها
- سرعت و دقت لازم در انجام وظایف محوله و انجام صحیح مستندسازی های لازم
- تشخیص صحیح نمونه های کنترل کیفی خارجی

دستورالعمل نگهداری و استفاده از سویه های باکتریایی به روش بلند مدت و کوتاه مدت

هدف:

هدف از تهیه این دستورالعمل تدوین روش های صحیح و مناسب ذخیره سازی و نگهداری باکتری ها به روش طولانی و کوتاه مدت، و چگونگی استفاده از آنها برای مقاصد مختلف مانند برنامه تضمین کیفیت (ارزیابی کیفی محیط های کشت، معرف ها، دیسک های آنتی بیوتیک و ...) انجام آزمایش های تأییدی یا تکمیلی (بررسی الگوی مقاومتی سویه ها با آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی، بررسی های اپیدمیولوژی و ...) در بخش میکروب شناسی آزمایشگاه می باشد. روش مناسب، روشی است که باکتری بتواند در آن شرایط زنده مانده، ضمن این که ویژگی هایش حفظ شده و پایدار بماند.

نمونه:

کشت تازه و خالص میکروارگانیسم روی محیط جامد مناسب

مواد، لوازم و تجهیزات:

- محیط محافظت کننده از سرما مانند ٪۵۰ fetal calf serum ، ٪۱۰ glycerol در 15% Tryptic Soy Broth (TSB)i ، یا Skim milk ، یا خون دفیبرینه گوسفند
- محیط کشت آگار خوندار پلیتی
- محیط کشت شکالت آگار پلیتی
- محیط کشت آگار خوندار شیبدار لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت شکالت آگار شیبدار لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)i لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت Cystine Tryptic Agar (CTA)i لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA)i شیبدار لوله ای درپیچ دار
- محیط کشت Cooked Meat لوله ای در پیچ دار
- روغن معدنی یا پارافین مایع استریل
- ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک درپیچ دار استریل
- یخچال
- فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد

روش انجام آزمایش:

نگهداری طولانی مدت (یک سال یا بیشتر):

نگهداری طولانی مدت باکتری ها این امکان را می دهد که نمونه میکروبی، ماه ها و حتی سال ها به صورت زنده باقی بماند. بهترین روش های نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون(Freeze Drying) ، نگهداری در فریزر $-70^{\circ c}$ (Ultra Low Freezer)iیا پایین تر و نگهداری در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه سانتیگراد می باشد.

روش های انتخابی و در دسترس:

۱ -نگهداری در فریزر $-70^{\circ c}$ i(Ultra Low Freezer)

- باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت آگار حاوی ۵ ٪خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسم های سخت رشد (پرنیاز) روی محیط شکلات آگار کشت دهید.
- پلیت ها را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد و در صورت نیاز برای هر باکتری تحت شرایط CO_2 انکوبه نمایید.
- بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مرفولوژی کلنی ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تست های بیوشیمیایی انجام دهید.
- سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۵۰-۱۰۰ میلی لیتر از یک محیط محافظت کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمایید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلول های باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می گیرد.

محیط های محافظت کننده از سرما عبارتند از:

- Skim milk
- خون دفیبرینه استریل گوسفند یا خرگوش

- Tryptic Soy Broth (TSB)iحاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۰-۱۵%
- fetal calf serum in broth۵۰٪

1. از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار ۰-۵/۱ میلی لیتر در ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد کافی ویال ذخیره را برای مصرف یک سال آماده نمایید.
2. بر روی ویال ها برچسب حاوی نام (یا کد) سویه و تاریخ تهیه سوسپانسیون را بچسبانید .ویال ها را در فریزر ۷۰- تا۵۰- درجه سانتیگراد قرار داده و تا زمان مورد نیاز در آن ذخیره نمایید. سویه ها را می توان در برودت کمتر از ۵۰- درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری کرد.
3. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد می توان سویه ها را در فریزر ۲۰ -درجه سانتیگراد نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به این نکته ضروری است:
4. سویه های باکتریایی در این برودت عمر کمتری (حداکثر یک سال) دارند و ممکن است تعداد زیادی از سلول ها از بین بروند. بنابراین توصیه می شود برای اطمینان از زنده بودن سویه ها در فواصل چند ماهه، از کشت ذخیره فریز شده، کشت مجدد بر روی محیط مناسب تهیه شود.
5. در صورت نیاز، یک ویال از کشت ذخیره فریز شده را بیرون آورده و محتویات آن را سریعاً زیر آب جاری ولرم ذوب نمایید.
6. سوسپانسیون را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتری های سخت رشد) تلقیح نمایید، به گونه ای که کلنی های ایزوله رشد کنند. پلیت را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای
۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید (ساب کالچر اولیه). قبل از استفاده برای آزمایش، از کشت ذخیره فریز شده، دو بار ساب کالچر انجام دهید. ساب کالچر دوم همان کشت کاری (Culture working) می باشد.
7. پلیت ها را در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد(در مورد ارگانیسم های غیر سخت رشد) یا شرایط مناسب برای هر نوع میکروارگانیسم نگهداری نمایید.

توجه:

- ویال ذخیره مورد استفاده، بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شود و نباید مجدداً فریز گردد.
- قبل از استفاده از سویه رشد یافته روی هر پلیت باید از خالص بودن سویه، اطمینان حاصل نمود.
- از کشت ذخیره فریز شده حداکثر تا ۳ پاساژ پشت سر هم میتوان انجام داد. پس از آن، پلیت باید دور انداخته شود و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر استفاده گردد .پاساژهای پشت سر هم مکرر (بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه ها را افزایش می دهد.

Quality Control Organisms	Storage Conditions	Type of Stock Culture	Length of Storage
All	Per manufacturer	Lyophilized	Until expiration date
Rapidly growing bacteria and yeast	2-8 °C	Working QC Cultures	4 weeks
	2-8 °C	Stock QC Cultures	≤12 months
	≤-20 °C	Suspension in Cryopreservative	≤12 months
	≤-50 °C	Suspension in Cryopreservative	Indefinitely
Anaerobes, mycobacteria, bacteria w/special growth requirements	≤-20 °C	Suspension in Cryopreservative	≤12 months
	≤-50 °C	Suspension in Cryopreservative	Indefinitely
Moulds	25-30 °C	Oil Overlay or Water Cultures	Indefinitely
	≤-20 °C	Spore Suspension	Indefinitely

۲ -نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط BHIA

- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA)i را با شیب کم در لوله شیشه ای درپیچ دار تهیه نمایید. برای باکتری های سخت رشد، خون تازه یا خون حرارت داده شده، به محیط اضافه نمایید.
- روغن معدنی) یا پارافین مایع(را در اون استریل نمایید.
- میکروارگانیسم مورد نظر را روی سطح محیط کشت دهید و در شرایط مناسب برای هر میکروارگانیسم انکوبه نمایید.
- بعد از اطمینان از وجود رشد کافی، روغن استریل را به مقدار یک میلی لیتر روی سطح محیط بریزید، به گونه ای که سطح شیبدار محیط را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید.
- در صورت نیاز به کشت مجدد سویه، با لوپ استریل از قسمت زیرین روغن برداشته و روی محیط آگار خوندار یا شکلاته کشت دهید.
- از لوله ذخیره بعد از ۶-۱۲ ماه تجدید کشت نمایید.

۳ -نگهداری در دمای اتاق با کشت در محیط TSA

این روش فقط برای باکتری هایی که سخت رشد نیستند، مانند استافیلوکک و انتروباکتریاسه به کار می رود.

- محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات را با عمق زیاد در لوله شیشه ای درپیچ دار تهیه کنید. محیط Tryptic Soy Agar (TSA)i پیشنهاد می شود.
- باکتری را به صورت کشت عمقی در این محیط تلقیح کنید.
- محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملا در لوله را بپوشاند.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید. از لوله ذخیره بعد از ۶-۱۲ ماه تجدید کشت نمایید.

نگهداری کوتاه مدت (کمتر از یک سال):

۱ -کشت در محیط CTA برای نیسریا و استرپتوکک

- محیط کشت Cystine Tryptic agar (CTA)i به اضافه یک میلی لیتر سرم استریل اسب را با عمق زیاد در لوله شیشه ای درپیچ دار تهیه کنید.
- سویه نیسریا یا استرپتوکک را به طور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد و CO_2 پنج درصد انکوبه نمایید.
- سپس لوله درپیچ دار را در پارافین مذاب فرو ببرید، که کاملا درِ لوله را بپوشاند.
- برای نیسریاها لوله را در ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری کنید و هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید. برای استرپتوکک ها لوله را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.

۲ -کشت در محیط Cooked Meat برای باکتری های بی هوازی

- محیط Cooked Meat را در لوله های شیشه ای درپیچ دار تهیه کنید.
- باکتری را در این محیط تلقیح کنید. محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- لوله ها را با رعایت شرایط ایمنی در دمای اتاق نگهداری کنید.
- هر دو ماه یکبار تجدید کشت نمایید.

۳ -کشت درTSA (Tryptic Soy Agar)i برای باکتری های با رشد سریع

- باکتری مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله ای درپیچ دار کشت دهید.
- محیط را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر ۲-۴ هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

۴ -کشت در Sheep blood Agar (آگار خوندار) برای استرپتوکوک ها

- سویه مورد نظر را در سطح محیط آگار خوندار لوله ای درپیچ دار کشت دهیدد.
- محیط را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.
- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید.
- هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

۵ -کشت در Chocolate Agar (شکلات آگار) برای مننگوکک و هموفیلوس

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار لوله ای یا پلیتی کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
- لوله یا پلیت را بعد از رشد در حرارت اتاق نگهداری کنید.
- هر دو هفته یکبار تجدید کشت نمایید.

۶ -کشت در Chocolate Agar برای گونوکک

- سویه مورد نظر را در سطح محیط شکلات آگار پلیتی یا شیبدار لوله ای کشت دهید.
- لوله یا پلیت را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در ۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.
- پس از این مدت، لوله یا پلیت را مجدداً در این درجه حرارت (۱ ± ۳۶ درجه سانتیگراد) نگهداری نمایید.
- هر دو روز یکبار تجدید کشت کنید.

بخش انگل شناسی:

آزمایش میکروسکوپی نمونه های مدفوع

معمولاً آزمایش میکروسکوپی نمونه های مدفوع متشکل از سه مرحله جداگانه شامل :
1- تهیه گسترش مستقیم 2- روشهای تغلیظ نمونه 3- روشهای رنگ آمیزی دائمی می باشد

الف- تهیه گسترش مستقیم(مرطوب)

گسترش مستقیم را می توان در کوتاهترین مدت و با حداقل امکانات تهیه نمود.
در صورت مثبت بودن آنها از نظر وجود انگل، می توان یک گزارش اولیه سریع به پزشک ارائه داد و گزارش نهائی را موکول به انجام آزمایش با استفاده از روشهای تغلیظ و رنگ آمیزی دائمی نمود.
در آزمایش مستقیم به علت برداشت حجم بسیار کمی از مدفوع، امکان دستیابی به انگل خیلی کم است. همچنین در صورت یافتن انگل، به علت اینکه بعضی از تک یاخته ها خیلی کوچک می باشند به سختی می توان در گسترش مستقیم نوع آنها را تعیین نمود.

اهداف تهیه گسترش مستقیم شامل:

1- ارزیابی میزان آلودگی بیمار 2- تشخیص سریع نمونه هایی که آلودگی شدید دارند3- بررسی حرکت ارگانیسم می باشد.

این روش آماده سازی باید بر روی نمونه های تازه مدفوع که در یخچال نگهداری نشده و یا با مواد نگهدارنده مخلوط نگردیده است، انجام گیرد. در این روش، مراحل مختلف زندگی اغلب انگلهای روده ای (تروفوزوئیت، کیست، لارو و تخم) ، اووسیست کوکسیدیاها ، اجسام کروماتوئید موجود درکیست و حرکت تروفوزوئیت ها را می توان تشخیص داد.
در مورد نمونه های تازه ای که در ماده نگهدارنده قرار داده نشده اند، محلول 0/85 ٪ کلرورسدیم در آب و یا محلول ید به عنوان رقیق کننده استفاده می شود. برای نمونه های نگهداری شده در فرمالین و یا مواد نگهدارنده دیگر، مواد نگهدارنده نقش رقیق کننده را نیز ایفا می کنند.
باید توجه نمود که ید و مواد نگهدارنده مانند فرمالین باعث کشته شدن ارگانیسم شده و حرکت آن را نمی توان بررسی نمود.
تهیه گسترش مستقیم با محلول ید باعث می شود که هسته و بیشتر عناصر داخل کیستهای انگل مشخص گردند. معمولاً در این گونه آماده سازی، تروفوزوئیت ها شکل طبیعی خود را از دست می دهند. تخم کرمها و لاروها قابل شناسایی هستند اما بعضاً جزئیات داخلی آنها نامشخص می شود.
برای تشخیص اولیه اووسیست کریپتوسپوریدیوم تهیه نمونه با محلول ید پیشنهاد می گردد، زیرا معمولاً اووسیستها ید را جذب نکرده و شفاف می مانند (برخلاف مخمرها و دیگر عناصر مدفوع که رنگ زرد ید را جذب می نمایند) اما به هر حال باید تشخیص قطعی کریپتوسپوریدیوم با رنگ آمیزهای اختصاصی و یا استفاده از کیت دارای آنتی بادی منوکلونال اختصاصی انجام گیرد.
اووسیست ایزوسپورابلی نیز می تواند در گسترش مستقیم دیده شود. اسپورهای میکروسپوریدیا آنقدر کوچک هستند که ممکن است با ذره های کوچک موجود در محیط اشتباه شوند، بنابراین معمولاًدر گسترش مستقیم تشخیص صحیح داده نمی شوند.

در امتحان میکروسکوپی نمونه مدفوع ممکن است عناصر زیر دیده شوند:

1- تروفوزوئیت و کیست تک یاخته های روده ای
2- اووسیست کوکسیدیا و اسپورهای میکروسپوریدیا که تشخیص این اسپورها از ذره های کوچک موجود در محیط مشکل است .
3- تخم کرمها و لاروها
4- گلبولهای قرمز که ممکن است دلیل زخم یا عوامل دیگر خونریزی دهنده باشد.
5- گلبولهای سفید مخصوصاً نوتروفیلها که ممکن است دلیل التهاب باشد.
6- ائوزینوفیلها که معمولاً دلیل وجود یک پاسخ ایمنی است(که ممکن است در ارتباط با وجود عفونتهای انگلی و یا علل دیگر باشد).
7- ماکروفاژها که ممکن است به دلیل حضور عفونتهای باکتریایی یا انگلی باشد.
8- کریستالهای شارکوت لیدن که بقایای ائوزینوفیلهای تخریب شده است (ممکن است به دلیل وجود عفونتهای انگلی و یا علل دیگر باشد).
9- قارچها (انواع کاندیدا) و مخمرهای دیگر و یا قارچهای شبه مخمر .
10- سلولهای گیاهی، دانه های گرده و اسپورهای قارچها که ممکن است شبیه تخم کرمها، کیست تک یاخته ها و اووسیست کوکسیدیا و یا اسپورهای میکروسپوریدیا باشد.
11- فیبریا ریشه گیاهان و یا موی حیوانات که ممکن است شبیه لارو کرمها باشد.

<u>روش انجام آزمایش مستقیم</u>

1- یک قطره سرم فیزیولوژی 0/85٪ رادر طرف چپ و یک قطره از محلول لوگل را در طرف راست لام قرار می دهیم.
2- مقدار خیلی کمی از مدفوع (به اندازه 2 میلی گرم و یا در حدی که نوک یک اپلیکاتور را به داخل نمونه فرو کنیم) را در سرم فیزیولوژی به حالت یکنواخت در می آوریم.اگر بیشتر از این مقدار برداشته شود،گسترش رقیق شده و احتمال مشاهده انگل کم می شود.

عمل فوق را بوسیله اپلیکاتور دیگری با محلول لوگل انجام می دهیم.می توان یک قطره از محلول متیلن بلوی بافره را نیز بر روی لام دیگری قرار داد و به طریقه فوق نمونه مدفوع را در آن به حالت یکنواخت در آورد.

جهت بررسی نمونه های فوق یک لامل (mm) 22*22 بر روی نمونه تهیه شده قرار می دهیم .

ترجیحاً می توان نمونه های تهیه شده در سرم فیزیولوژی و ید را بر روی لامهای جداگانه ای قرار داد که در این صورت امکان جاری شدن مایع بر روی میکروسکوپ کاهش می یابد.

اگر نمونه آبکی یا موکوئیدی باشد، نمونه برداری بوسیله اپلیکاتور مشکل است، لذا از دو اپلیکاتور به کمک هم طوری استفاده کنید که حالت یک قاشقک را ایجاد نماید.

جهت بررسی گسترش ابتدا با عدسی با بزرگنمائی کم (10*) تمام قسمتهای گسترش (لامل) را بررسی می کنیم. اگر مورد مشکوکی مشاهده گردید از عدسی با بزرگنمائی (40*) برای بررسی جزئیات استفاده می نمائیم . حتی در مواردی که مورد مشکوکی مشاده نگردید ، حداقل یک سوم سطح لامل باید با عدسی با بزرگنمائی 40* مورد بررسی مجدد قرار گیرد.

معمولاً تک یاخته ها نور را منعکس می کنند و چون این گونه ارگانیسم ها کمرنگ می باشند، می توانند نور را از خود عبور دهند و مشاهده آنها مشکل گردد، بنابراین باید با نور کم گسترشها را بررسی نمود.

زمانیکه نور زیاد باشد بیشتر ارگانیسمها به خوبی مشاهده نمی شوند(تجربه نویسنده : بخصوص در زمانیکه نمونه محتوی اووسیست ایزوسپورابلی باشد).

بهتر است عمل کاهش نور را به جای پائین آوردن کندانسور با بستن دیافراگرم انجام دهید. میزان نور باید به نحوی تنظیم شود که عناصر سلولی موجود در مدفوع به خصوص کیست تک یاخته ها بتوانند نوررامنعکس کنند.

اگر اطراف لامل کاملاً با پارافین مذاب مسدود شده باشد، می توان با استفاده از عدسی روغنی (بزرگنمایی 100*) آن را بررسی نمود. ترجیحاً در این موارد استفاده از لامل ضخیم توصیه می شود.

در صورت استفاده از محلول غلیظ ید عناصر داخل مدفوع به یکدیگر چسبیده و سبب کاهش انکسارو عبور نور از ارگانیسم و باعث اشکال در تشخیص می گردد و چنانچه محلول رقیق ید مورد استفاده قرار گیرد، عناصر داخل ارگانیسم به خوبی رنگ نمی گیرند. استفاده از محلول لوگلی که در رنگ آمیزی باکتریها استفاده می شود، به دلیل غلظت آن جهت رنگ آمیزی انگلها توصیه نمی گردد.
چنانچه در بررسی گسترش ، حرکت تروفوزوئیت کم شده باشد، می توان با قرار دادن یک سکه کوچک گرم شده درکنار گسترش ، حرکت آن را تحریک نمود. همچنین با فشار روی لامل نیز می توان باعث حرکت مایع و تحریک تروفوزوئیت جهت حرکت نمودن گردید.

گزارش نتایج :

مثالهایی از گزارش نتیجه مثبت نمونه مدفوع، شامل موارد زیر می باشد:

1- **Giardia lamblia trophozoites present .**
2- **Entamoeba coli cysts present .**
3- **Ascaris lumbricoides eggs present .**
4- **Strongyloides stercoralis larva present.**
5- **Lsospora belli oocysts present.**

همه عناصر و سلولهای موجود در نمونه مدفوع نیز باید تشخیص داده شده و گزارش گردند مانند:

Moderate charcot – leyden crystals present.
Few red blood cells (RBCS) present.

جمع آوری نمونه مدفوع:

نمونه برداری باید به نحوی انجام پذیرد که امکان تشخیص و جداسازی هر انگلی وجود داشته باشد. تشخیص عفونتهای انگلی به امتحان میکروسکوپی مدفوع، ادرار، خون ، خلط، بافت و در مواردی بررسی ماکروسکوپی نمونه استوار است. نمونه ها باید در یک ظرف دهان گشاد تمیز پلاستیکی یا مومی جمع آوری گردد. در پیچ ظرف باید کاملاً محکم باشد تا رطوبت نمونه حفظ گردد.
نمونه ها نباید با آب یا ادرار مخلوط شود زیرا سبب بی حرکت شدن تروفوزوئیت تک یاخته و یا موجب از بین رفتن آن می گردد. آلودگی اتفاقی نمونه با خاک و یا آب ممکن است باعث گردد که نمونه به ارگانیسم های دارای زندگی آزاد که موجود در آب و یا خاک می باشند آلوده شده که در این مورد به آسانی با تک یاخته های انگلی اشتباه می شوند و جمع آوری نمونه از توالت فرنگی وغیره نیز مناسب نمی باشد.
تداخل مواد: بعضی از مواد مانند روغنهای معدنی، باریم (کریستالها مانع مشاهده انگل به خصوص تک یاخته هامی گردند) بیسموت ، آنتی بیوتیکها (تتراسیکلین) ، داروهای ضدمالاریا و مواد غیر قابل جذب ترکیبات ضد اسهالی در جداسازی انگلهای روده ای تداخل می کنند. بعد از مصرف مواد فوق بوسیله بیمارممکن است برای مدت یک هفته تا چند هفته نتوان انگل را تشخیص داد،معمولاًدو ماده ای که به مقدار زیاد توسط بیماران مصرف می گردد باریم و آنتی بیوتیک است که تتراسیکلین باعث کاهش یا از بین رفتن انگل ها (مخصوصاً تک یاخته ها) می گردد و در چنین مواردی باید نمونه برداری بعد از گذشت 7 روز انجام شود.
اگر چه بسیاری از آزمایشها مانند روش الایزا،ایمونوفلورسانس وغیره جهت تشخیص آنتی ژن باید با نمونه مدفوعی که در فرمالین 5٪،10٪ ومحلول سدیم استات فرمالدئید نگهداری شده است استفاده شود،ولی برخی از روشها نیاز به مدفوع تازه یا فریز شده دارد.پس نحوه جمع آوری نمونه برای هر کیت و یا روش تشخیصی در آزمایشگاه باید مد نظر قرار گیرد.

ثبت مشخصات نمونه:

هر نمونه باید دارای مشخصات نام بیمار، نام پزشک ، شماره آزمایشگاه ، تاریخ و زمان جمع آوری نمونه باشد. برگه درخواست پزشک باید ضمیمه شده و در آن اطلاعات اضافی مانند تشخیص احتمالی بیماری با توجه به علائم آن و یا تاریخچه مسافرت به منطقه خاص واطلاعات مورد لزوم دیگر درج گردیده باشد.

باید توجه نمود که چون هرنمونه مدفوع می تواند به عنوان یک منبع مهم باکتری، ویروس و انگل باشد ،لذا باید به عنوان یک منبع آلوده کننده مهم محسوب گردد.

تعداد نمونه

حداقل سه نمونه، به صورت هر روز یا یک روز در میان باید جمع آوری گردد.(به دلیل اینکه معمولاًبعضی از تک یاخته ها و تخم کرمها به صورت تناوبی دفع می گردند).

در مواردی که بیمار اسهال و درد شکم نداشته باشد می توان دو نمونه را به طور معمول ویک نمونه را بعد از استفاده از یک مسهل مانند سولفات منیزیم وغیره جمع آوری نمود.از مسهل های روغنی نبایداستفاده کرد زیرا روغن باعث کندی حرکت تروفوزوئیت شده و به علت تغییر شکل انگل، تشخیص را مشکل می سازد.در مواردی که پزشک مشکوک به آمیبیاز روده ای باشد جمع آوری 6 نمونه بسیار کمک کننده است و سبب تشخیص عفونتهای آمیبی به میزان 90٪ می گردد،اما معمولاً کمتر توسط پزشک درخواست می گردد.

در صورت مثبت بودن آزمایش انگل در نوبت اول ، حتماً دو نوبت دیگر نیز باید مورد بررسی قرار گیرد، چون ممکن است بیمار به دو یا چند انگل مختلف آلوده باشد.

زمان جمع آوری :

اگر نمونه های مدفوع به صورت یک روز در میان جمع آوری گردد،3 نمونه را باید حداکثر در فاصله زمانی 10 روزجمع آوری کرد.اگر منظور جمع آوری 6 نمونه باشد،باید آنها را حداکثر در فاصله زمانی 14 روز جمع آوری کرد.

***باید توجه نمود که نباید در طی یک روز بیشتر از یک نمونه از بیمار جمع آوری نمود.**

زمان صحیح آزمایش نمونه بعد از جمع آوری:

بستگی به روش جمع آوری نمونه در آزمایشگاه دارد چون بعضی از آزمایشگاهها از مواد نگهدارنده استفاده می کنند.

زمان صحیح به شرح زیر است:

باید در فاصله زمانی 30 دقیقه بعد از جمع آوری نمونه آزمایش شود.	مایع(آبکی)	**Liquid(Watery)**
باید در فاصله زمانی 30 دقیقه بعد از جمع آوری نمونه آزمایش شود .	نرم	**Soft**
باید در فاصله زمانی 60 دقیقه بعد ازجمع آوری نمونه آزمایش شود.		**Semi formed**
همان روز یا روز بعد می تواند آزمایش شود.	کاملاً شکل دار	**Formed**

باید توجه نمود که می توان نمونه را در یخچال 5-3 درجه سانتیگراد نگهداری نمود که در این حالت، تخمها ، لاروها و کیستهای تک یاخته ها تا چند روز بدون تغییر شکل حفظ می شود اما باید توجه نمود که نمونه ها یخ نزند. چون در اثر نگهداری در دمای زیر صفر، خصوصیات ظاهری انگل تغییر می کند. نمونه نگهداری شده در یخچال برای انجام آزمایش مستقیم به هیچ وجه مناسب نیست چون تروفوزوئیت تک یاخته از بین می رود. همچنین نمونه ها را به هیچ وجه نباید در انکوباتور قرار داد به علت اینکه دمای آن باعث تخریب انگل می گردد.

اگرچه نگهداری نمونه تازه مدفوع در یخچال ممکن است تخریب انگلها رابه تاخیر بیندازد، اما در صورت عدم توانایی در انجام به موقع آزمایش جهت حفظ خصوصیات ظاهری تروفوزوئیت ها، بهتر است نمونه مدفوع را در ماده نگهدارنده قرار داد و آن را در فرصت مناسب آزمایش نمود.

قوام نمونه

قوام نمونه ممکن است از آبکی تا کاملاً شکل دار و حتی سخت (**hard**) متغیر باشد، که می توان در موقع نمونه گیری آنها را بررسی نمود ودر ابتدا نمونه های آبکی وشل را آزمایش نمود.
طبق نظریه سازمان جهانی بهداشت ، بیشتر تقسیمات زیرمد نظر بوده و باید ثبت و گزارش گردد.
Watery, Loose, Soft. Formed

معمولاً قوام مدفوع تاحدودی مشخص می کند که چه شکلی از انگل را می توان در آن یافت.
تروفوزوئیت آمیبها و تاژکداران بیشتر در نمونه های آبکی یا شل دیده می شود و سریعاً در درجه حرارت اتاق از بین می روند. همچنین ممکن است در نمونه نرم **(soft)** نیز تروفوزوئیت تک یاخته ها مشاهده گردد. معمولاً خصوصیات ظاهری کیستهای موجود در نمونه شکل دار، در درجه حرارت اطاق و در فاصله زمانی یک روز تغییر نمی کند. تخمها و لاروها در هر نمونه ای با هرگونه قوام ممکن است مشاهده گردند اما در نمونه های آبکی به علت رقیق بودن نمونه ، شانس یافتن آنها کم می شود، اما در درجه حرارت اطاق به نسبت تروفوزوئیتها و کیستها خصوصیات خود را از دست نمی دهند. فقط اگر بعضی ازتخمهای کرمهای قلابدار بیشتر از یک روز در درجه حرارت اطاق بماند تبدیل به، لارو شده و یا در این شرایط ممکن است لاروهای فیلاریفرم استرونژیلوئیدس استرکورالیس مشاهده گردد.
بعضی مواقع کرم آسکاریس،کرم سنجاقی و یا بندهای کرمهای نواری ممکن است در سطح یا زیر مدفوع مشاهده شود. بندرت ممکن است کرم تریکوسفال ، کرم قلابدار و هیمنولپیس نانا در مدفوع مشاهده شود و معمولاً دفع این کرمها بعد از درمان یا مصرف مسهل مشاهده می گردد.
جهت جدا نمودن این انگلها، می توان مقداری از نمونه را با سرم فیزیولوژی مخلوط کرده و سپس آن را از چند لایه گاز مرطوب صاف نمود. در مورد عفونتهای انگلی ناشی از کرمها، باید 1 تا 2 هفته بعد از درمان، آزمایش مدفوع را تکرار نمود. در مورد عفونتهای انگلی ناشی از تک یاخته، این کنترل باید 3 تا 4 هفته بعد از درمان انجام گرفته و در مورد افراد مداوا شده برای عفونت ناشی از کرم تنیا، 6-5 هفته بعد از درمان، انجام آزمایش مجدد توصیه می گردد.

نگهداری نمونه ها:

اغلب یک فاصله زمانی بین جمع آوری نمونه تا رسیدن آن به آزمایشگاه و یا زمان انجام آزمایش نمونه وجود دارد. اگر این مدت زمان بیشتر از فاصله زمانی ذکر شده باشد باید فوراً نمونه را بعد از جمع آوری و یا بعد از دریافت بوسیله آزمایشگاه در ماده نگهدارنده قرار داد.
اگر تعداد نمونه های مدفوع آزمایشگاه زیاد است ، باید نمونه ها را مورد بررسی قرار داد و درابتدا سریعاًنمونه های شل، آبکی و یا دارای خون و موکوس را آزمایش نمود و یا بعداز ثبت خصوصیات ظاهری آنها در ماده نگهدارنده قرار داد .
مواد نگهدارنده متنوعی وجود دارد که پر مصرف ترین آنها، فرمالین 5٪ یا 10٪ است که می توان در روی این نمونه عمل تغلیظ را نیز انجام داد. مواد نگهدارنده دیگر شامل

سدیم استات- استیک اسید- فرمالین **(SAF) = Sodium Aceteate- Acetic Acid Formalin**می توان روی نمونه نگهداشته شده در این ماده عمل تغلیظ و رنگ آمیزی ر ا انجام داد ومانند فیکساتیوشاودین و پلی وینیل الکل حاوی کلرورمرکوریک نمی باشد. فیکساتیو سدیم استات- استیک اسید- فرمالین مایع بوده و برای تهیه رنگ آمیزی دائمی استفاده می شود. گسترش هاباید باآلبومین مخلوط با رسوب مدفوع تهیه شده تا از چسبندگی آن اطمینان حاصل شود.
مورفولوژی ارگانیسم درگسترش های تهیه شده درمحلول سدیم استات- استیک اسید- فرمالین که با رنگ آهن- هماتوکسیلین رنگ آمیزی شده اند، نسبت به نمونه های رنگ شده با تریکروم از کیفیت مطلوب تری برخوردار می باشند.

Merthiolate – lodin –formalin= (MIF) مرتیولات -آیدین-فرمالین

از نمونه نگهداری شده در این ماده می توان جهت تهیه گسترش مستقیم و انجام روشهای تغلیظ استفاده نمود. اما تهیه گسترش رنگ آمیزی با کیفیت مطلوب از آن آسان نمی باشد. بخصوص در مورد نمونه های حاوی تروفوزوئیت تک یاخته، که در رنگ آمیزی خصوصیات آن مشخص نمی شود.
Schaudinn’ s fixative

این ماده ثابت کننده جهت نمونه های مدفوع تازه و یا هر نمونه تهیه شده از مخاط روده (نمونه های حاصل از سیگموئیدوسکوپی) مناسب می باشد

(PVA) = Polyvinyl Alcohol پلی وینیل الکل

اگرچه هر دو روش تغلیظ و رنگ آمیزی را می توان در مورد نمونه های نگهداری شده در این ماده بکار برد، اما طبق توصیه **clinical and laboratory standards Institute = CLSI = NCCLS** بهتر است عمل تغلیظ را روی نمونه های نگهداری شده در فرمالین و عمل رنگ آمیزی را روی نمونه نگهداری شده در **PVA** انجام داد.

باید توجه نمود که نسبت بین مدفوع و ماده نگهدارنده باید به نسبت یک قسمت از مدفوع و سه قسمت ماده نگهداری بوده و کاملاً با هم مخلوط شوند. به طور کلی مدت زمان مجاورت مدفوع و ماده نگهدارنده نباید کمتر از 30 دقیقه باشد. نمونه های مدفوع موجود در ماده نگهدارنده می تواند در درجه حرارت اطاق نگهداری شوند.

فرمالین: بیشترین ماده ثابت کننده ای است که جهت تخم کرمها، لاروها، کیست تک یاخته ها و اووسیت استفاده می شوند. معمولاً فرمالین خریداری شده، یک محلول آبی 37٪ از گاز فرمالدئید می باشد و در موقع ساخت محلولهای ثابت کننده انگل شناسی باید به عنوان یک محلول 100٪ در نظر گرفته شود. دو غلظت مورد استفاده از فرمالین 5٪ و10٪ می باشد . اگرچه تهیه محلول 5٪ آن برای تمام اهداف توصیه می شود اما تمام کارخانه های سازنده کیتهای حاوی ماده نگهدارنده فرمالین، از محلول 10٪ آن استفاده می نمایند چون توانائی بیشتری را جهت کشتن تخم کرمها دارد .

می توان بر روی نمونه های نگهداری شده در فرمالین، عمل تغلیظ را انجام داد. اما نمی توان بر روی این نمونه روشهای رنگ آمیزی را بکار برد.

روش تهیه فرمالین 10٪ : فرمالدئید**(usp)**،100 میلی لیتر- محلول سرم فیزیولوی 0/85٪ ، 900 میلی لیتر

روش تهیه فرمالین 5٪ = فرمالدئید **(usp)**، 50 میلی لیتر – محلول سرم فیزیولوژی 0/85٪ ، 950 میلی لیتر

طرز تهیه = 100 میلی لیتر (یا جهت تهیه محلول 5٪ ، 50 میلی لیتر) از فرمالدئید را با 900 میلی لیتر (یا 950 میلی لیتر جهت تهیه محلول 5٪) از محلول سرم فیزیولوژی **g/L** 8/5 رقیق می کنیم.

(باید توجه نمود که از آب مقطر نیزمی توان به جای سرم فیزیولوژی استفاده نمود)

استفاده از فرمالین گرم (60 درجه سانتیگراد) جهت جلوگیری از آلودگی تخمهای کرم توصیه می شود.

بررسی خصوصیات ظاهری نمونه:

اصولاً بررسی ظاهر مدفوع و گزارش کامل آن به پزشک اهمیت بسیار زیادی جهت تشخیص بیماری دارد. این بررسی کمک بسیار زیادی به تشخیص عفونتهای انگلی ، یرقانها، خونریزیهای دستگاه گوارش، اسهال، سوء جذب وغیره می نماید بنابراین باید شکل وقوام، رنگ،وجود موکوس، خون، موادغذایی هضم نشده وسایر موارد بررسی وبه پزشک گزارش گردد.

بررسی خصوصیات ظاهری نمونه مدفوع باید روی نمونه های تازه انجام شود و نمی توان این بررسی را درنمونه های موجود درماده نگهدارنده انجام داد. از طرفی تروفوزوئیت انگلها نیز در این مواد بیحرکت می شود. بنابراین گرفتن یک نمونه تازه جهت تشخیص پروتوزوئرهای متحرک و نیز بررسی خصوصیات ظاهری ، ضروری می باشد.

مدت زمان نگهداری نمونه:

تازگی نمونه یک عامل مهم در تشخیص عفونتهای انگلی است چون مرحله تروفوزوئیت تک یاخته ها خیلی زود، بعد از خروج از بدن ، از بین می رود. ثبت تاریخ و زمان جمع آوری نمونه نیز ضروری بوده و باید انجام شود.

وجود خون و موکوس میتواند به دلیل عفونت آمیبی ، باکتریائی ، التهاب ، کولیت ، بدخیمی وغیره باشد که جهت یافتن تروفوزوئیت آمیبها حتماً باید از این قسمتها نمونه برداری را انجام داد.

وجود خون تیره در مدفوع می تواند دلالت بر خونریزی زیاد در مجاری معده- روده ای داشته و بر عکس وجود خون روشن دلالت بر خونریزی قسمتهای تحتانی دارد.

رنگ مدفوع می تواند برحسب نوع تغذیه، مصرف دارو، بیماری وغیره تغییر کند.

مصرف سبزیجات زیاد باعث رنگ سبز ، مصرف گوشت، رنگ آن را تیره و مصرف لبنیات رنگ آن را روشن می سازد.
آهن رنگ مدفوع را سیاه و باریم رنگ آن را قهوه ای روشن یا سفید می کند که این رنگ می تواند نشان دهنده عدم وجود صفرا در مدفوع نیزباشد.
مدفوع با قوام نرم یا شل و بارنگ خاکستری می تواند به دلیل اسهال چرب باشد.

Routine Urine Analysis

یک ازمایش روتین کامل ادرار شامل آزمایش های ادرار از نظر رنگ ، منظره ، pH ، وزن مخصوص ، پروتئین ، گلوکز، کتون ها، خون مخفی ، نیتریت ، اوروبیلینوژن، اسیدآسکوربیک ، بیلیروبین و اوروبیلینوژن و...همچنین بررسی میکروسکوپی رسوب ادرار می باشد بررسی ادرار از دو نظر انجام می شود :

1) تشخیص بیماری های کلیوی و مجاری ادراری
2) تعیین بیماری های متابولیک یا سیستمیک که در ارتباط مستقیم با کلیه نیست.

به طور کلی آزمایش های تجزیه ادرار به سه بخش مجزا تقسیم می شود:

1)آزمایش های فیزیکوشیمیایی

2)آزمایش های شیمیایی

3)میکروسکوپی ادرار

آزمایش های فیزیکوشیمیایی ادرار :

شامل ازمایش های حجم ادرار،رنگ، منظره، وزن مخصوص، pH واسمولالیتی

حجم ادرار:

به طور میانگین حجم ادرار 24 ساعته از600ml-2000 در تغییر است.

پلی اوری : افزایش حجم ادرار (به صورت غیر طبیعی) بیش از 3000 ml که در دیابت شیرین و بی مزه دیده می شود.

الیگوری :کاهش حجم ادرارکمتر از 500 ml/24h گفته میشود که در نفریت حاد و شوک رخ می دهد.

رنگ ادرار:

از زرد کمرنگ تا تیره کهربائی ناشی از رنگدانه های :

اوروکروم: رنگدانه زردرنگ

اوروبیلین: رنگدانه قهوه ایی رنگ

اورواریترین: رنگدانه ایی که به ادرار رنگ متمایل به قرمز می دهد.

فاکتورهای مختلفی به رنگ ادرار تاثیر می گذارند شامل داروها، رژیم غذایی و همچنین مواد شیمیایی

ادرار بی رنگ یا کم رنگ ممکن است خیلی رقیق باشد که در نتیجه مصرف مایعات ، دیورتیک های طبیعی مثل قهوه ، الکل ویا حالتی از دیابت باشد .

معمولترین علت قرمزی رنگ ادرار وجود اریتروسیت ها است و یا وجود هموگلوبین آزاد (هموگلوبینوری) یا میوگلوبین یا مقادیر زیاد رنگدانه اوروایتترین که در بیماری تب دار حاد در ادرار ظاهر می شود.

ادراری که اریتروسیت ها یا رنگدانه (هم)Heme دارند می تواند از رنگ صورتی تا سیاه تغییر رنگ دهد.

علت دیگر رنگ قهوه ایی تیره تا سیاه آلکاپتونوری است در این حالت ادرار وقتی بتازگی از مثانه خالی شود رنگ طبیعی دارد اما در اثر ماندن یا زمانی که ادرار قلیایی شود به رنگ تیره بر می گردد.

در بیماران با ملانومای بدخیم به علت آزاد شدن رنگدانه ملانوژن که بعد از اینکه در معرض نور قرار گرفت به ملانین تبدیل شده وباعث سیاهی ادرار می شود.

در یرقان انسدادی ،رنگدانه های صفراوی دفع می شوند که رنگ ادرار از زرد متمایل به قهوه ایی تا زرد متمایل به سبز تغییر می کند.

رنگدانه سبز مربوط به بیلی وردین است که وقتی ادرار بماند رنگ سبز شدت می یابد.

داروها ورنگ های شیمیائی نیز می توانند سبب تغییر رنگ ادرار گردند مثلا مولتی ویتامین به ادرار رنگ زرد روشن می دهد یا مثلا نیتروفورانتوئین باعث رنگ قهوه ایی می شود یا متوکاربامول باعث رنگ سیاه ادرار می شود.

Appearance (منظره ادرار):

ادرار طبیعی معمولا شفاف clear است.

اما ممکن است کدر (Cloudy) گردد که مربوط به فسفات آمورف (سفیدرنگ که در اسید به خوبی حل می گردد ودر ادرار قلیائی وجود دارد.)

اورات آمورف در ادرار اسیدی است واغلب رسوب صورتی رنگ بوده وبا حرارت دادن به خوبی حل می شود .

لوکوسیت ها ، موکوس ، چربی ، و...سبب کدورت در ادرار می گردند.

پیوری :یا وجود چرک در ادرار زمانی که در هر شاین میکروسکوپ رسوب ادرار بیش از 10-5 عدد لوکوسیت باشد .

با توجه به اینکه وجود پیوری به تنهائی نشانه خاص عفونت میکروبی نمی باشد بهتر است ازآزمایش کشت ادرار همزمان انجام گیرد.

pH یا واکنش ادرار:

pH ادرار انعکاس توانائی کلیه در حفظ غلظت یون هیدروژن پلاسما ومایعات بین سلولی است.

pHادرار به وسیله غلظت آزاد یون هیدروژن تعیین میشود.حدود طبیعی pH ادرار بین 8-4/6 می باشد که حد متوسط آن حدود 6 یعنی اسیدی است.

به طور طبیعی pH می تواند از اسیدی تا قلیائی در تغییر باشد.

شرایط پاتولوژیک که سبب ادرار اسیدی می شوند شامل (اسیدوز تنفسی ، اسیدوز متابولیک هستند مثلا در کتواسیدوز دیابتی ، اورمی ، اسهال شدید وگرسنگی ادرار اسیدی می شود.

در آلکالوز تنفسی وآلکالوز متابولیک همراه با استفراغ pHادرار قلیائی می شود. عفونت های ادرار ناشی از باکتری های اوره از مثبت مثل پروتئوس و سودوموناس سبب افزایش pH تا 9 می شوند وادرار قلیائی می گردد.

به دلیل اینکه این باکتری ها اوره را به آمونیاک تبدیل میکنند در ادراری که می ماند pHادرار قلیائی می گردد بنابراین اندازه گیری pHدر ادراری که مانده ارزش تشخیصی ندارد. معرف برای تعیین pH روی نوار ادراری متیل رد وبرمو تیمول بلو است که محدوده رنگ پرتقالی تا آبی (تغییرات رنگ) را شامل میشود حدود pH5تا 9 رادر بر میگیرد.

وزن مخصوص ادرار:

عبارت است از وزن ادرار به وزن هم حجم آب مقطر در دمای ثابت که معرف غلظت مواد حل شده در ادرار است.
با توجه به اینکه وزن مخصوص در طول روز تغییر میکند خواندن یک نمونه راندوم اطلاع کافی از چگونگی کار کلیه بدست نمیدهد.
وزن مخصوص می تواند دیابت بی مزه را از دیابت شیرین تفکیک کند در هر دو بیماری حجم ادرار افزایش می یابد امادر دیابت بیمزه وزن مخصوص ادرار تحت تاثیر مولکول های پروتئین وگلوکز قرار می گیرد .
برای اندازه گیری وزن مخصوص از رفراکتومتر استفاده می شود.

آزمایش های شیمیائی ادرار:

شامل پروتئین ، گلوکز، کتون ها وخون مخفی وهمچنین بیلی روبین ، اوروبیلینوژن ونیتریت می باشند. که توسط نوارهای ادراری خوانده می شوند وتغییرات رنگ را با مقایسه با رنگ کارخانه سازنده می خوانند این نوارها باید دور از نور مستقیم ، حرارت ورطوبت قرار گیرند همچنین نباید در یخچال قرار گیرند.نوار باید در ادرار تازه وخوب مخلوط شده وغیر سانتریفوژ شده وارد کرده وفورا خارج گردد وبا رنگ رویی ظرف قوطی نوار ادراری مقایسه گردد وبه صورت کیفی (مثبت یا منفی) وبرخی کمی (trace تا 4+) گزارش شود.

اندازه گیری پروتئین ادرار:

آزمایش های بیماریابی در مورد پروتئینوری بر اساس معرف های رنگی یا براساس رسوب پروتئین توسط حرارت یا اسید می باشد. بهتر است که روش نواری با یکی از تست های اسیدی بکار رود.
تست نواری حساسیت بیشتری نسبت به آلبومین دارد در حالی که تست های حرارتی واسیدی نسبت به تمام پروتئین ها حساسیت دارند.
در هر روشی که مورد استفاده قرار گیرد امکان آلودگی ادرار با ترشحات واژن ، اسپرم ،موکوس فراوان ، چرک وخون وجود دارد که باعث مثبت کاذب می گردد.
ادرار خیلی رقیق منفی کاذب میدهد ، نمونه ادرار صبحگاهی برای آزمایش پروتئین مناسب است زیرا تحت تاثیر عوامل وضعیتی قرار نمی گیرد وتغلیظ شده است.
تست نواری به آلبومین خیلی حساس است آلبومین پروتئینی است که به طور اولیه در نتیجه ضایعه یا بیماری گلومرولی ترشح می شود دیگر پروتئین های ادراری مثل گاماگلبولین ، گلیکوپروتئین ، لیزوزیم ، هموگلوبین ، موکوپروتئین تام –هورسفال ، وپروتئین بنس جونز با این روش به خوبی البومین جواب نمی دهند بنابراین نتیجه منفی ضرورتا حضور دیگر پروتئین ها رارد نمی کند.
تست های اسیدی شامل اسید سولفوسالیسیلیک، تری کلرواستیک ، واسید نیتریک می باشند.که سولفوسالیسیلیک اسید بیشترین کاربرد را دارد زیرا احتیاج به حرارت ندارد.
نمونه ادرار سانتریفوژ شده را مورد آزمایش قرار می دهند حجم مساوی از ادرار را با محلول اسید مخلوط میکنند ودرجه کدورت را می خوانند :

بدون کدورت : منفی

کدورت مشخص است اما دانه دار نیست : 1+

کدورت مشخص ودانه دار است:2+

کدورت خیلی شدید همراه با مجتمع های قابل تشخیص :3+

کدورت شدید ومتراکم همراه با مجتمع های بزرگ که ممکن است رسوب کند :4+

مثبت کاذب : در بیمارانی که تحت درمان با داروهای تولبوتامید، پنی سیلین وسولفونامیدها هستند یا بعد از تزریق رنگ های رادیوگرافی مثبت میگردد.یا اگرنوار ادراری مدت زیادی در ادرار باقی بماند به علت اینکه بافر موجود در بالشتک شسته شده وpHبالشتک افزایش می یابدوبدون اینکه پروتئینی در کار باشد رنگ آبی یا سبز پدیدار می شود.

منفی کاذب:

در ادرار کاملا قلیائی ونمونه های ادراری که خیلی رقیق شده به صورت کاذب پروتئین منفی میشود.

گلوکز:

وجود مقادیر قابل توجه گلوکز در ادرار را گلوکزوری می نامند معمولا در افراد طبیعی گلوکز در ادرار وجود ندارد مگراینکه مقدار گلوکز خون بیش از 160 mg/dl-180برسد که این را آستانه طبیعی کلیه برای گلوکز می نامند.

منفی کاذب زمانی است که ادرار حاوی غلظت های بالای ویتامین c باشد زیرا واکنش آنزیمی را مهار میکند اسید آسکوربیک یا ویتامین cبه وسیله H_2O_2 اکسید شده وتشکیل رنگ را مهار میکند.کروموژنی که در میان معرف های شیمیائی نوارهای مختلف به کارمیرود فرق میکند.

به طور متوسط سطح کتون بادی های بالای 40mg/dl میتواند حساسیت تست راکاهش بدهد وسبب منفی کاذب شوند.

اجسام کتونی در ادرار:

اسیداستواستیک ،استن ، بتاهیدروکسی بوتیرات هستند در صورتی که در ادرار باشند تغییر رنگ ادرار از صورتی تا زرشکی ایجاد میکنند نتیجه به صورت منفی ،trace، متوسط،زیاد گزارش می شود از آنجایی که استن فرار است می بایست نمونه ادرار در ظرف در بسته و در یخچال نگهداری شود.

خون مخفی در ادرار:

هموگلوبین آزاد حاصل از لیز اریتروسیت ها در ادرار طبیعی این تست منفی است ودر صورت مثبت شدن باید علت یابی شود.

هماچوری:وجود خون یا اریتروسیت های تنها در ادرار می گویند

میکروهماچوری: تعداد بیش از 2عدد اریتروسیت در هر شاین را هماچوری میکروسکوپی یا میکروهماچوری گویند.

هماچوری شدید: خون سبب تغییر رنگ ادرار می گردد وبه آسانی به طور ماکروسکوپی قابل دید است.

هموگلوبینوری حضور هموگلوبین آزاد در ادرار در نتیجه همولیز داخل عروقی است می تواند در بیماری های تب مخملک ،هموگلوبینوری حمله ایی سرد، حساسیت به با قلا رخ میدهد.

تست نواری براساس فعالیت پراکسیدازی هموگلوبین و میوگلوبین است که اکسیداسیون یک اندیکاتور را توسط پراکسیدآلی کاتالیز میکنند.اریتروسیت ها در روی بالشتک لیز میشوند وهموگلوبین آزادشده با معرف های شیمیائی واکنش میدهند ودر نتیجه رنگ سبز پدیدار می شود.نتایج تست را به صورت trace تا 3+ گزارش می کنند.نوار در مدت 60ثانیه خوانده می شود وتغییر رنگ از زرد تا سبز هست.مقادیر بالای ویتامینc نتیجه را کاهش داده وحتی نتایج منفی کاذب می دهد.اگرادرار با مقدار زیادی باکتری ها آلوده باشد به دلیل اکسیداز باکتریائی مثبت کاذب می دهد .اگر ادرار با خون قاعدگی آلوده باشد نتیجه مثبت کاذب می دهد.در صورتیکه تست خون مخفی مثبت باشد ولی اریتروسیتی در ادرار دیده نشود یا به تعداد کم دیده شود می توان از تست سولفات آمونیوم برای افتراق هموگلوبین یا میوگلوبینوری استفاده کرد.

2/8گرم سولفات آمونیوم +5سی سی ادرار خوب مخلوط کرده وسانتریفوژنمائید .سولفات آمونیوم هموگلوبین را رسوب می دهد اما میوگلوبین در محلول پایدار می ماند بنابراین اگر محلول روئی شفاف شد دلیل بر وجود هموگلوبین است اما اگر محلول رنگی ماند رنگدانه میوگلوبین است.

بیلی روبین واوروبیلینوژن ادرار:

بیلی روبین توتال یا غیر کنژوگه نمی تواند از طریق گلومرول های کلیه دفع شود بنابراین اگر یرقان یا زردی مربوط به افزایش بیلی روبین غیر کنژوگه باشد بیلی روبین در ادرار ظاهر نمی شود. اما اگر یرقان مربوط به بیلی روبین کنژوگه باشد بیلی روبین در ادرار ظاهر می شود.

در یرقان همولیتیک به دلیل افزایش تولید بیلی روبین به علت لیز بیش از حد اریتروسیت ها کبد قادر به کنژوگه کردن آن ها نبوده وبنابراین یرقان مربوط به بیلی روبین غیر کنژوگه است که در ادرار ظاهر نمی شودو تنها اوروبیلینوژن ادرار بالا می رود.

تست نواری: واکنش جفت شدن نمک دیازونیوم با بیلی روبین در محیط اسیدی است وتغییر رنگ از نخودی تا درجات مختلفی از رنگ خرمایی متمایل به ارغوانی است.

نتایج به صورت 1+ تا 3+ گزارش می شود.

مثبت کاذب به علت مصرف داروهایی مثل کلوپرومازین ومتابولیت های داروئی فنازوپیریدین است.

منفی کاذب در حضور اسید آسکوربیک زیاد ، مقادیر بالای نیتریت اتفاق می افتد.

اگر ادرار زرد متمایل به قهوه ای یا سبز متمایل به زرد رنگ بود وجود بیلی روبین مشکوک است. ادرار را تکان داده اگر کف زرد یا سبز متمایل به زرد ایجاد شد به احتمال زیاد مربوط به بیلی روبین است. رنگ زرد مربوط به رنگدانه بیلی روبین است .

نیتریت: روش غیر مستقیم وسریع برای کشف باکتریوری است. باکتری های ایجاد کننده عفونت ادراری عمدتاE.coli ، انتروباکتر ،سیتروباکتر ،کلبسیلا وپروتئوس هستند که نیترات را به نیتریت احیا می کنند. برای احیا شدن بایستی حداقل 4ساعت ادرار در مثانه بماند بنابراین ادرار اول صبح نمونه انتخابی برای تست نیتریت است.

نتیجه به صورت منفی یا مثبت گزارش می شود.حساسیت تست با وجود مقادیر بالای ویتامین C کاهش می یابد.

آزمایش میکروسکوپی رسوب ادرار:

بررسی میکروسکوپی قسمت مهم آزمایش تجزیه ادرار است که در تعیین و بررسی اختلالات کلیه و دستگاه ادراری از ارزش تشخیصی برخوردار است.آزمایش رسوب ادرار می بایست فورا بعد از جمع اوری ادرار انجام شود اما برای چند ساعتی که نتوان آن را انجام داد بایست نمونه داخل یخچال نگهداری شود.

برای آماده کردن رسوب ادرار ابتدا نمونه ادرار مناسب را تکان داده وحدودا 15-10 سی سی را در لوله ریخته و5 دقیقه بادور 2500-2000rpm سانتریفوژکرده ،سپس مایع روئی را دور ریخته و از رسوب ان یک قطره بین لام ولامل قرار داده وبا عدسی 40 می بینیم.

سلول های ادراری:

1)اریتروسیت ها:

وقتی که نمونه ادرار تازه باشد اریتروسیت های ان ظاهر طبیعی ، رنگ پریده ، یا متمایل به زرد دارند وصاف ومقعرالطرفین هستند دارای 7میکرون قطر وضخامت 2میکرون می باشند .در ادرار رقیق یا هیپوتونیک و ادرار قلیائی این سلول ها لیز می شوند .گاهی اوقات زمانی که ادرار هیپوتونیک باشد اریتروسیت ها متورم شده وامکان اشتباه با لکوسیت ها وجود دارد در اینجا تست نواری کمک کننده است. گاهی اوقات سلول های مخمری با اریتروسیت ها اشتباه می شوند به طور طبیعی اریتروسیت ها در ادرار دیده نمی شوند اگرمقدار خون د

ر ادرار دیده شود پروتئین ادرار نیز مثبت خواهد شد.

2)لکوسیت ها:

تقریبا 12-10میکرون قطر دارند بزرگتر از اریتروسیت ها هستند معمولا گرد وبه رنگ خاکستری تیره ویا سبز متمایل به زرد هستند لکوسیت ادرار می تواند به صورت تک تک یا clamp باشند در ادرار قلیائی یا هیپوتونیک تعداد لکوسیت ها یک ساعت بعد از جمع آوری ادرار وقتی که در دمای ازمایشگاه نگهداری شود تا 50درصد کاهش می یابد تعدادلکوسیت ها در ادرار زنان ، چند تائی بیشتر از تعدادطبیعی لکوسیت مردان است.

سلول های پوششی (Epithelial)

سلول های پوششی بزرگتر از لکوسیت ها بوده وبه اشکال مختلف دیده میشوند گاهی به صورت پهن ، مکعبی ، استوانه ایی گاهی گرد یا گلابی شکل یا دارای زوائد دمی شکل می باشند.

بلورها یا کریستال های ادراری:

کریستال ها در ادراری که به تازگی گرفته شده پیدا نمیشوند اما بعد از اینکه مدتی در حرارت آزمایشگاه بمانند ظاهر می شوندو بسیاری از این کریستال ها اهمیت کلینیکی کمی دارند.

الف)کریستال های اسیداوریک: به شکل منشور لوزی دیده میشوند این کریستال ها در سود حل می شوند اما در اسید استیک اسید کلرید ریک والکل غیر محلولند .

ب)کریستال های اگزالات کلسیم: این کریستال ها بیرنگ، هشت ضلعی یا پاکتی شکل یا بسته پستی یا دمبلی شکل دیده می شوند اندازه های مختلفی دارند.اغلب در ادرار قلیائی وبعداز مصرف غذاهای اگزالات دار مثل گوجه فرنگی ، اسفناج ، پرتقال ویا مصرف ویتامین c دیده می شوند.

پ) اورات آمورف: نمک های اورات اغلب به صورت شکل آمورف غیر کریستال وجود دارند اهمیت کلینیکی ندارند با اسیدی کردن ادرار با اسید استیک تبدیل به کریستال اسید اوریک می شوند.

ج)فسفات آمورف : نمک های فسفات غالبا در ادرار به صورت غیر بلوری و به فرم آمورف وجود دارند ، شکل خاصی ندارند واز نظر کلینیکی هم اهمیت ندارند.

د) تریپل فسفات (فسفات آمونیوم – منیزیوم)

این کریستال ها در ادرار خنثی وقلیائی ایجاد می شوند کریستال های منشوری ، بی رنگ 6-3 گوشه وانتهای مورب دارند ودر اسید استیک محلولند ودر تشکیل سنگ های ادراری نقش دارند .

سیلندرهای ادراری:

وجود سیلندر ها همراه با پروتئینوری است سیلندرها تقریبا کناره های موازی و انتهاهای گرد یا لبه دار دارند در اندازه واشکال مختلف هستند ممکن است پیچیده ، مستقیم یا خمیده باشند. سیلندرها همیشه منشا کلیوی دارند و نشانه مهم بیماری داخل کلیه هستند.

1)سیلندر هیالن: (شفاف) بیشترین سیلندرهای موجود در ادرار می باشند که از پروتئین تام – هورسفال تشکیل شده است و فقط از جنس پروتئین می باشند ضریب انکسار خیلی پائینی دارند بنابراین باید با نور خیلی کم دنبال سیلندرها ی هیالن گشت. دیدن چند سیلندر هیالن در ادرار طبیعی است وافزایش تعداد آن غالبا بعد از ورزش فیزیکی ، ادرار غلیظ ونمونه های ادرار اسیدی دیده می شود.

2)**سیلندر گلبول قرمز: Red cell cast**

سیلندرهای اریتروسیتی ، هماچوری کلیوی را می رسانند این سیلندرها به رنگ قهوه ایی تا تقریبا بی رنگ ظاهر می شود .گلبول های قرمز در داخل سیلندر ممکن است به صورت دسته های متراکم یا پراکنده دیده شوند.

3)سیلندر گلبول سفید :WBC cast

وقتی که لکوسیت های چند هسته ایی در داخل یک سیلندر قرار بگیرند نتیجه آن یک سیلندر چرکی با گلبول های سفید می باشد.لکوسیت هایی که در داخل این سیلندر ها وجود دارند تقریبا اکثرشان نوتروفیل های چند هسته ایی هستند ولی ممکن است گاهی یک لنفوسیت نیز دیده شود. با دژنره شدن گلبول های سفید که در داخل سیلندر قرار دارند کناره این سلول ها در یکدیگر ادغام شده ومحو می شوند و سیتوپلاسم انها دانه دار میگردد ویک سیلندر گرانولار تشکیل می شود .

سیندر گرانولار : در نتیجه دژنراسیون سیلندرهای سلولی یا جمع شدن مستقیم پروتئین های سرم در داخل ماتریکس موکوپروتئین تام – هورسفال ایجاد می شود .این دانه ها می توانند درشت یا ریز باشند.

سیلندر مومی waxy cast :ضریب انکسار نور بالائی دارند به رنگ خاکستری ،زرد یا بیرنگ هستند ، ظاهر یکدست صاف دارند اغلب سیلندرهای پهن با انتهای شکسته یا نوک دار وکناره های ترک دار دیده می شوند ودر نتیجه دژنراسیون سیلندرهای دانه دار دیده می شوند.

ساختمان های فرعی موجود در رسوب ادرار:

1- **باکتری:** ادراری که در کلیه ومثانه است به طور طبیعی فاقد باکتری است ، تعداد باکتری ها مخصوصا اگر همراه با لکوسیت باشد معمولا دلالت بر عفونت دستگاه ادراری می کند.
2- **مخمر:** سلول های مخمر صاف ، بی رنگ، بیضی شکل با دیواره های انعکاسی دوگانه اغلب با اریتروسیت ها اشتباه می شوند برخلاف اریتروسیت هادر اسید و قلیا غیر محلولند . در عفونت های دستگاه ادراری بخصوص افراد دیابتی دیده می شوند کاندیدا البیکنس معمولترین مخمری است که در ادرار ظاهر می شود.
3- **اسپرماتوزوئید**
4- **رشته های موکوس** : رشته های بلند ، نازک ، موجی ونواری شکل می باشند وگاهی نیز به شکل خط مستقیم دیده می شوند در تعداد کمی از افراد به طور طبیعی در ادرار دیده می شوند.
5- **انگل ها**

تریکوموناس واژینالیس تک یاخته تاژکداری است عامل تریکومونیازیس است 25-10 میکرون اندازه دارد دارای 4تاژک آزاد است و یک تاژک چسبیده به بدن که تشکیل پرده مواج می دهد. این تک یاخته شکل کیستی ندارد وغالبا همراه لکوسیت ها وسلول های اپیتلیال است.

روش های تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

تشخیص مالاریا

تشخیص مالاریا توسط میکروسکوپ معمولی روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا باقی مانده است و ارزان و قابل اعتماد می باشد.تستهای تشخیصی سریع، گران قیمت بوده ولی سریع و راحت هستند. تستهای سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی بادی های تولیدشده علیه مراحل غیرجنسی خونی ازانگل مالاریا استوار می باشند.

روش سرولوژی بهترین روشی است که به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست. تکنیک های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه های تحقیقاتی مناسب، گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می توانند برای شناسایی گونه ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا در برخی از نمونه ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته اند مفید باشند.

روشهای تشخیص آزمایشگاهی مالاریا

1 - مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون

ساده ترین راه تشخیص انگل، مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه خون برای دیدن انگل مالاریا بوده که هنوز استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا است. تشخیص میکروسکوپی مالاریا توسط رنگ آمیزی گسترش خون ضخیم و نازک روی اسلاید شیشه ای به دیدن انگل مالاریا منجر می شود.

روش نمونه گیری

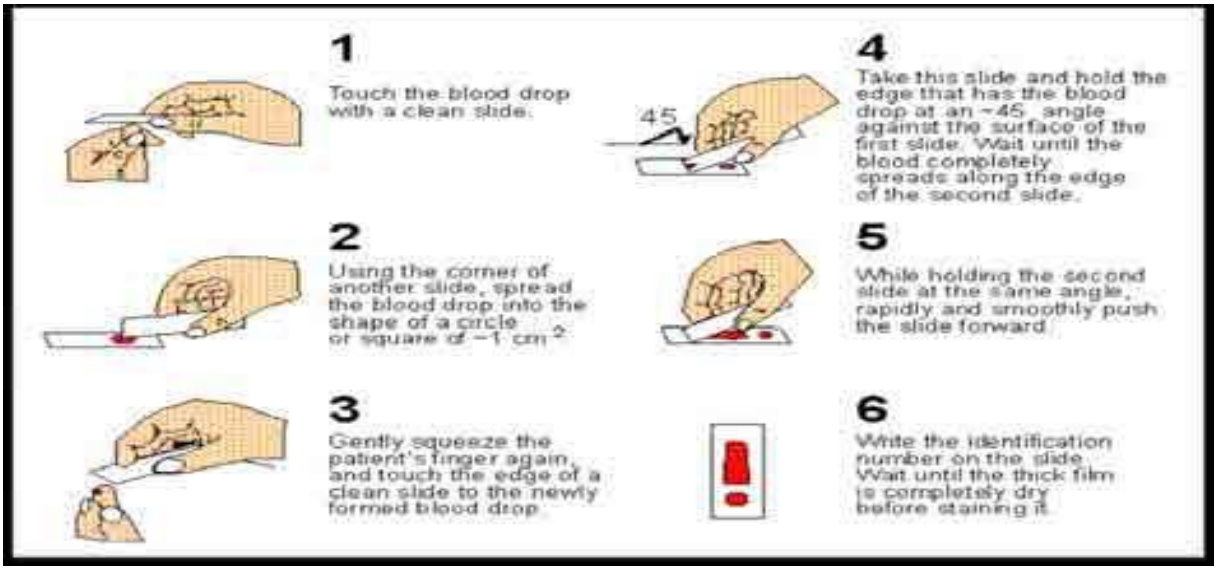
1 - تهیه اسمیر خونی مستقیم

انگشت بیمار با الکل تمیز، بعد خشک می شود.

در سمت نوک انگشتان با یک لانست استریل نوکتیز و یا سوزن، دو قطره خون بر روی یک لام شیشه ای قرار داده می شود.

برای تهیه یک اسمیر خونی ضخیم، یک قطره خون در یک حرکت دایره ای با گوشه ای از لام هم زده می شود. باید مراقب بود تا هنگام آماده سازی، نمونه بیش ازحد ضخیم نباشد و نیز باید اجازه دهیم تا بدون افزودن مواد ثابت کننده، خشک گردد. ازآنجاکه گلبول های قرمز فیکس نشده اند با استفاده از قطره آب لیز می شوند.

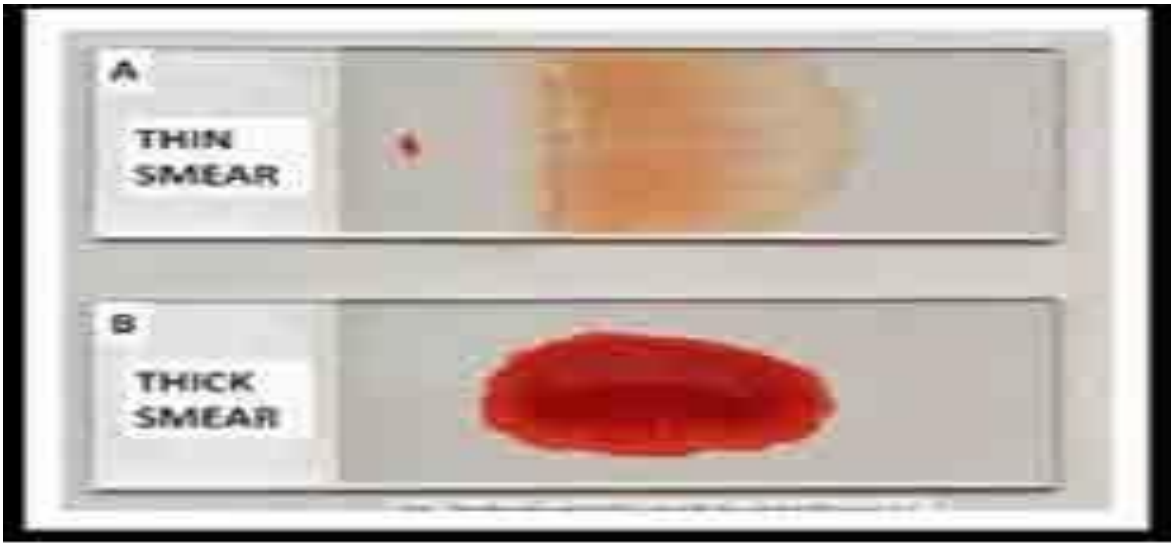
شکل 1- مراحل تهیه گستر شهای خونی ضخیم و نازک از خون محیطی



برای تهیه اسمیر خونی نازک بلافاصله با لبه صاف از یک لام دیگر قطره خون را با زاویه 45 درجه بین لام و سطح قطره بهم می زنیم و سپس لکه خون را با حرکات رفت وبرگشت سریع و یکنواخت در امتداد سطح لام تهیه می کنیم.

اسمیرها باید در مقابل هوا خشک شده و با متانول فیکس گردند. از آنجا که حجم زیادی از خون روی گسترش ضخیم قرار می گیرد، بنابراین گسترش ضخیم خیلی حساس تر از گسترش نازک است.

شکل 2- اسمیر خونی نازک (A) و ضخیم (B)از خون محیطی برای تشخیص مالاریا



2 - تهیه اسمیر داخل جلدی

یکی دیگر از روش های تشخیص عفونت با مالاریا اسمیر داخل جلدی است که به وسیله سرسوزن اندازه 25 سوراخ های باریکی در روی ساعد دست ایجاد می کنند. نباید از سوراخ خون تراوش کند ولی خونابه سرمی تحت تأثیر فشار روی یک لام شیشه ای قرار داده شده و اجازه می دهند تا در معرض هوا خشک شده و سپس با متانول فیکس می نمایند. این اسمیر ممکن است لکوسیت های حاوی رنگدانه را نشان داده و نیز اشکال بالغ تری از پلاسمودیوم فالسیپاروم را مشخص می کند.

روش های رنگ آمیزی برای تشخیص مالاریا:

رنگ آمیزی گیمسا به مدت 30 - 20 دقیقه

رنگ آمیزی لیشمن به مدت 45 دقیقه

روش سریع صحرایی به مدت 10 ثانیه

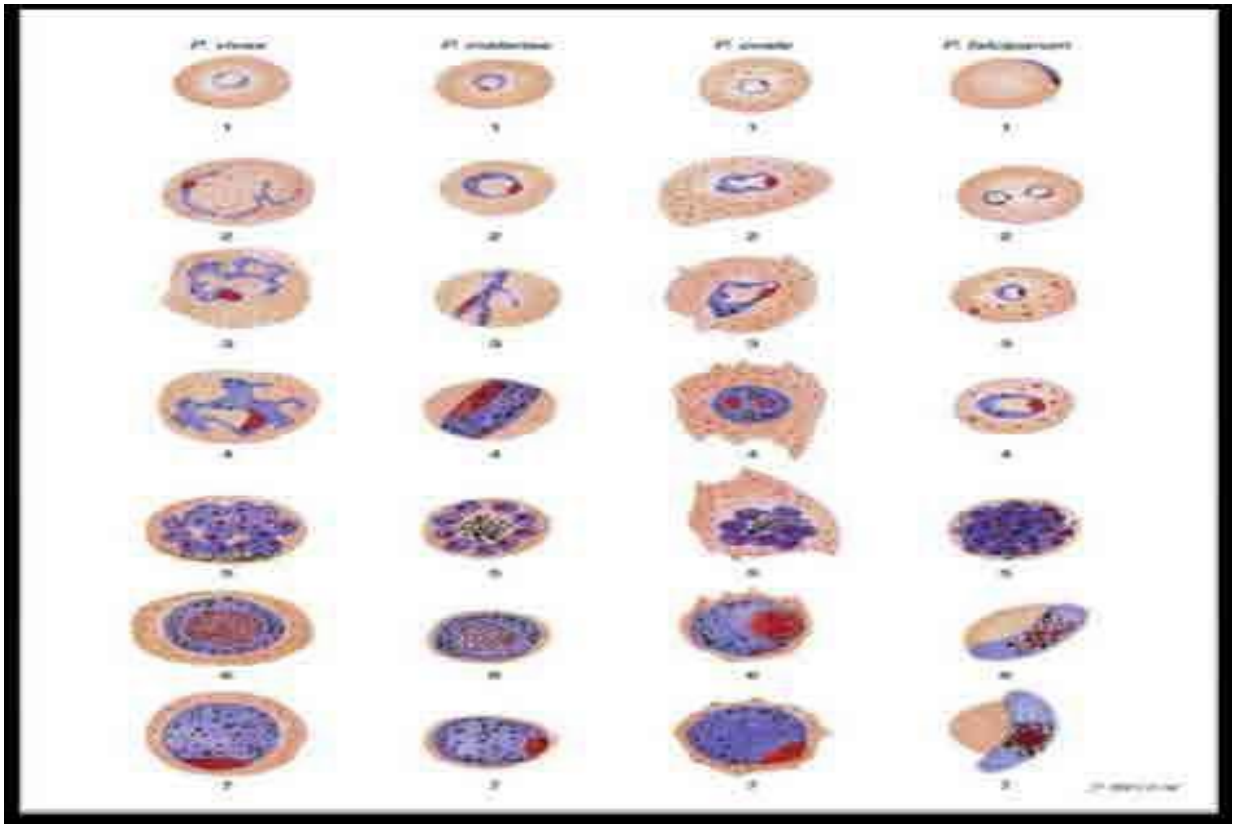
نتایج و تفسیر مشاهدات میکروسکوپی

با استفاده از میکروسکوپ های نوری تعداد باندهای خونی، گون ها و مراحل مرفولوژیکی از انگل گزارش شده است. گاهی اوقات انگل ها در گستره خون محیطی بیماران مبتلا به مالاریا یافت نمی شوند، اما رنگدانه مالاریا ممکن است در چرخه فاگوسیتوز در لکوسی تها دیده شود، این یک نشانه شاخص از عفونت جدید مالاریا است و در مورد عفونتی که درمان کامل یا نسبی شده در غیاب انگل مشاهده می گردد.

حضور رنگدانه در لکوسیت از نظر کمی و کیفی با بار انگل در ارتباط است و بنابراین نشان دهنده یک عفونت بالینی قابل توجه به ویژه در مناطقی است که انتقال بیماری کم است. زمانی که در اسمیر نازک از خون محیطی انگل وجود ندارد، ممکن است در آسپیراسیون مغز استخوان یافت شود.

اسمیر خون علاوه بر تشخیص مالاریا می تواند به لحاظ پیش آگهی بیماری هم اطلاعات مفیدی را ارائه دهد؛ تعداد انگل، تعداد فاگوسیت های حاوی رنگدانه و وجود اواخر مرحله غیرجنسی انگل همگی با پیش آگهی مرگبار بیماری رابطه مستقیم دارند.

شکل 3- اشکال مختلف زیستی 4 گونه انگل مالاریا



2 - رو شهای مولکولی

تکنیک های مولکولی بهتر است در آزمایشگاه های تحقیقاتی مناسب، گسترش مقاومت به دارو و عود را بررسی نمایند و می توانند برای شناسایی گونه ها در زمانی که تعداد انگل بسیار کم است و یا در برخی از نمونه ها که در معرض از بین رفتن قرار گرفته اند، مفید باشند.

•واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) اجازه می دهد تا قسمت خاصی از یک منطقه انتخاب شده از ژنوم مالاریا تکثیر یابد. این روش بسیار اختصاصی و حساس است و قادر به تعیین ژنوتایپ می باشد.

•علاوه بر این آنالیز، استفاده از PCR (SNP) تشخیص انگل هایی مقاوم به دارو و نیز عفونتهای مخلوط را ممکن می سازد، بااین حال PCR گران بوده و نیازمند یک آزمایشگاه پیشرفته همراه با کارکنان مجرب و دوره دیده است.

3 -روش بافی کوت کمی(Quantitative buffy coat method)

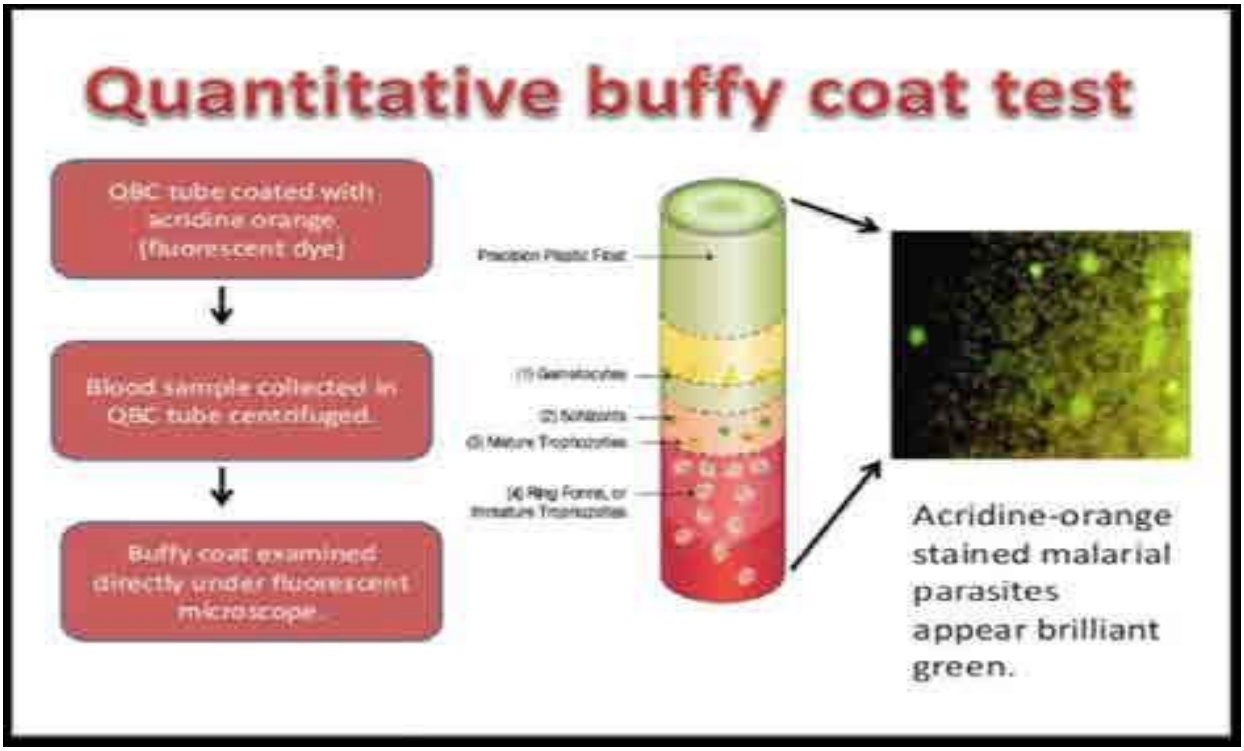
این روش شامل رنگ آمیزی لایه سلول های قرمز سانتریفوژشده و فشرده کردن با آکریدین نارنجی تحت یک منبع نور ماوراءبنفش می باشد که یک روش برای شناسایی انگل مالاریا در خون محیطی است و از لحاظ حساسیت شبیه به روش میکروسکوپی اسلاید خون ضخیم معمولی است و باید همراه با گسترش ضخیم خون برای غربالگری استفاده شود و طی مراحل زیر انجام می گردد:

•خون از طریق سوراخ کردن انگشت در یک لوله هماتوکریت حاوی آکریدین نارنجی و ضدانعقاد جمع آوری می گردد.

•لوله هماتوکریت را در دور 12000 در مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ می کنند.

•بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ مجهز به یک منبع نور UV مورد بررسی قرار می دهند. هسته انگل به رنگ فلورسانس سبز روشن و سیتوپلاسم آن به رنگ زرد نارنجی مشاهده می شود.

شکل 4- روش بافی کوت نیمه کمی (QBC) برای تشخیص انگلهای مالاریا



4 - روش های سرولوژی

تست های سرولوژیکی برای تشخیص عفونت مالاریا بر اساس شناسایی آنتی بادی های تولیدشده علیه مراحل غیرجنسی خونی از انگل مالاریا استوار می باشند. روش سرولوژی بهترین روشی است که به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک استفاده می شود و مناسب برای تشخیص مالاریای حاد نیست.

روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم(IFA)

اولین آزمون سرولوژیکی مورد استفاده برای تشخیص آنتی بادی مالاریا می باشد.

در این روش از آنت یژن ویژه و یا آنتی ژن خام آماده متصل شده درروی یک اسلاید که در دمای 30- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگه داشته شده است، استفاده می شود و به روش کمی هر دو آنتی بادی IgG و IgM در نمونه های سرم بیمار را بررسی می کنند.

•تیتر بالاتر از 1:20 مثبت و آنهائ یکه کمتر از 1:20 هستند مشکوک و یا با اهمیت کم طبقه بندی می شوند.

•تیترهای بالاتر از 1:20 دلیل محکمی بر عفونت جدید می باشد.

•تست های سرولوژی عفونت مالاریای سابق یا سابقه عفونت را تأیید می کنند و در بررسی های اپیدمیولوژی و غربالگری نمونه های خون جمع آوری شده برای بانکهای خون مفید هستند.

•ابزارهای لازم برای روش های سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت حاد مالاریا محدود بوده و با توجه به تأخیر در تولید آنتی بادی ها، عدم تأیید گونه و نیاز به میکروسکوپ فلورسنس (UV) مشکل است.

5 -کشت انگل مالاریا

از روش های دیگر تشخیصی بیماری مالاریا می توان به کشت انگل مالاریا به صورت زنده و تشخیص پس از مرگ از طریق تشخیص انگل های مالاریا و یا مشاهده رنگدانه در لوکوسیت ها در کالبدشکافی از طریق بیوپسی بافت ها از نمونه مغز، طحال و اسمیر نازک استخوان اشاره کرد.

6 - روشهای سریع

تشخیص آنتی ژن های انگل مالاریا در نمونه های انسانی مالاریا، نظیر هیستیدین غنی از پروتئین2 (HRP-II)یا لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیوم (pLDHرا می توان با آزمایش سریع point-of-care که بر اساس روش ایمونوکروماتوگراف می باشد، انجام داد.

مزایای استفاده از این تست ها سریع بودن و حساسیت بالای آنها است. معایب آن ها نیز هزینه نسبتاً بالا، عدم کارایی کافی در تشخیص بعضی از گونه های مالاریا و تنوع زیاد محصولات آنها می باشد. تست های بر پایه تشخیصی HRP II نتایج مثبت در فاز نقاهت بیماری به دلیل باقی ماندن HRP II در خون بعد از پاک شدن انگل را ارائه می کنند.

آزمایش تشخیص سل (توبرکلوزیس)

شخیص سل صرفاً بر اساس علائم و نشانه ها دشوار است. سل بیماری است که توسط میکروب میکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد شده و از طریق هوا از فردی به فرد دیگر منتقل می شود. در این بیماری اغلب ریه ها را درگیر می کند ولی سایر قسمت های بدن نظیر مغز، **کلیه ها** و مهره ها نیز درگیر می شوند. در فرد مبتلا به سل در هنگام سرفه و عطسه قطرات تنفسی حاوی باسیل پخش می شوند که با استنشاق این ذرات، افراد سالم را نیز مبتلا می کند.

توجه این نکته حایز اهمیت است که همه افراد آلوده شده به باکتری سل بیمار نمی شوند. دو مرحله سل نهفته و سل فعال در بیماری سل دیده می شود. در سل نهفته بیمار احساس ناخوشی ندارد و هیچ علامتی نیز ندارد، این افراد آلوده به باسیل هستند ولی سل فعال ندارند. در بعضی افراد باسیل سل بر **سیستم ایمنی** افراد غلبه می کند و باسیل شروع به تکثیر می کند و سل نهفته به سل فعال تبدیل می شود.

علائم بالینی جهت تشخیص سل:

شایع ترین علامت ابتلا به بیمار سل ریوی را سرفه پایدار به مدت دو هفته یا بیشتر می باشد که این سرفه معمولا همراه خلط و گاهی خلط خونی همراه است و علائمی از جمله تنگی نفس و درد قفسه سینه نیز در مبتلایان وجود دارد.

همچنین علائم عمومی و مشترک در بیماری سل ؛ تب، کاهش اشتها، کاهش وزن، بی حالی، تعریق شبانه، خستگی زودرس و ضعف عمومی می باشد.

به طور کلی سل دارای علائم زیر می باشد:

- سرفه ی مداومی که دست کم ۳ هفته طول کشیده باشد
- سرفه ی خلط دار که ممکن است در آن خون وجود داشته باشد

•کاهش اشتها و وزن

•حس خستگی و کسالت

•ورم کردن گردن

•تب

•تعریق شبانه

•درد قفسه سینه

آزمایش های تشخیص سل:

آزمایش ها و تست های مختلفی با توجه به شرایط بیمار جهت تشخیص سل وجود دارد .**مایکوباکتریوم** توبرکلوزیس یک عامل بیماری زا مهم انسانی است که شیوع آن در سراسر جهان، خطر جدی برای زندگی بشر محسوب می شود وهر ساله مرگ و میر زیادی را به دنبال دارد. در حال حاضر روش های مختلفی نظیر آزمایش پوستی، تهیه اسمیر و کشت خلط، آزمایشات بیوشیمیایی و روش های مولکولی برای تشخیص این باکتری وجود دارد .اما سرعت و دقت در تشخیص این بیماری بسیار حائز اهمیت است.

روش پوستی و روش رنگ آمیزی مستقیم خلط آزمایشات دقیقی برای تشخیص نهایی و شروع درمان نمی باشد و از حساسیت پایینی برخوردار هستند. همچنین کشت خلط زمان بر می باشد. از این رو روشی آسان، دقیق و بسیار حساس به عنوان آزمایش تایید کننده تشخیص بالینی ضروری به نظر می رسید.

در ادامه به انواع آزمایش هایی جهت تشخیص سل می پردازیم:

آزمایش PDDیا آزمون پوستی جهت تشخیص سل:

از جمله کاربرد های این آزمایش، تشخیص سل می باشد ولی با این تست نمی توان بیماری فعال را از آلودگی غیر فعال افتراق داد. روش های جستجوی حساسیت توبرکولینی به شرح زیر می باشد:

-1روش کیفی: روش ساده ای است اما دقت زیادی ندارد

الف:روش پوستی فون پیرکه :در سطح خارجی بازو یک قطره توبرکولین ریخته و با واکسینوتیل خراشی 8 تا 10 میلی متری ایجاد می کنند و 5 سانتی متر بالاتر خراشی به عنوان شاهد ایجاد می کنند.3 تا 5 روز بعد،نتیجه آزمایش خوانده می شود.قرمزی بیش از 4 میلی متر مثبت تلقی می شود ولی در محل شاهد واکنشی مشاهده نمی گردد.

ب:روش مورو :روش ساده ای می باشد.به این ترتیب که قطعه ای مشمع طبی که وسط آن مقداری محلول توبرکولین مالیده شده است را حوالی سینه یا سطح قدامی بازو می چسباندفپس از 24 ساعت مشمع را کنده ونتیجه را 3 روز بعد می خوانند.با پیدایش حداقل 3 ندول قرمز واکنش مثبت تلقی می گردد.

پ:روش چند سوزنه :از عیوب این روش کثرت موارد منفی کاذب به علت یکسان نبودن لایه توبرکولینی که از سوزن ها انتقال می یابد، است.

روش تست آزمون پوستی جهت تشخیص سل:

با استفاده از قطره چکان یک قطره از PPD را روی پوست تمیز و خشک در حد فاصل 1/3 فوقانی و 1/3 میانی قسمت قدامی ساعد می ریزیم.

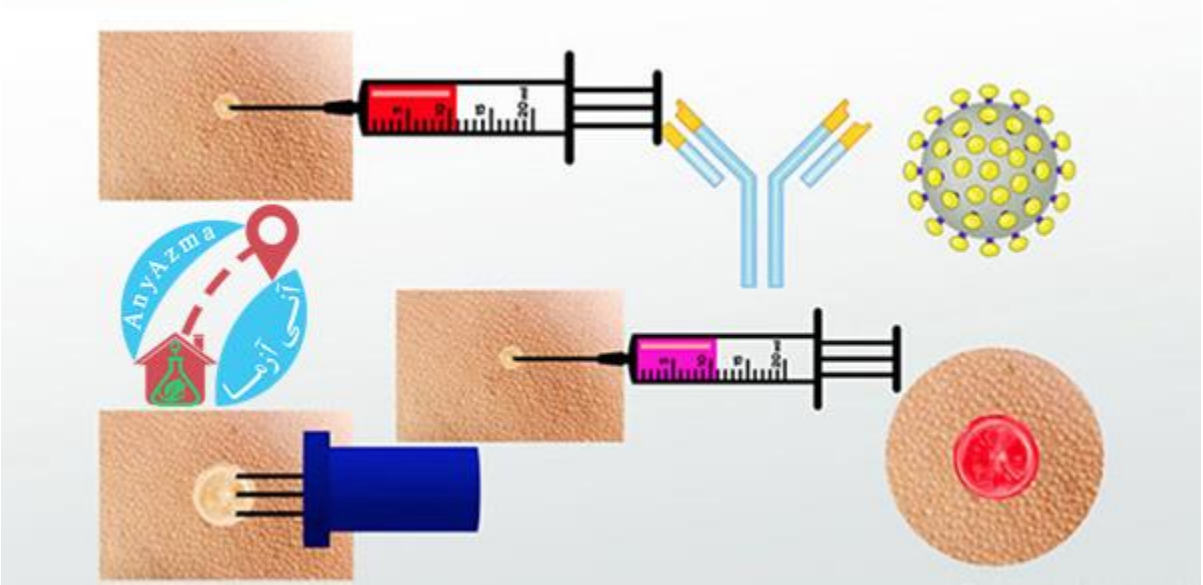
*محلول سوزن را تنظیم می کنیم (1 میلی متر برای بزرگسالان و 1 میلی متر برای کودکان خردسال)

*صفحه و سوزن طپانچه را در ظرف محتوی الکل می گذاریم، سپس آن را روی چراغ الکلی حرارت می دهیم.

*مدت 10 ثانیه یا بیشتر آن را خشک می کنیم.

*صفحه را محکم روی روی قطره توبرکولین قرار می دهیم.

*ماشه طپانچه را می کشیم تا سوزن ها آزاد شده و پوست را سوراخ کنند.(دقت شود که دست بیمار نسوزد)



اسمیر مستقیم خلط جهت تشخیص سل:

اسمیر مستقیم خلط روش روتین تشخیص سل می باشد. خلط زمانی ایجاد می شود که ریه های فرد، بیمار یا آسیب دیده باشد. خلط بزاق نیست اما موکوس ضخیم شده(گاهی اوقات به نام چرک نیز شناخته می شود) است که از ریه ها با سرفه خارج می شود. بدن برای حفظ رطوبت بافت های نازک و ظریف دستگاه تنفسی موکوس تولید می کند، ذرات کوچک خارجی که ممکن است خطرناک باشند، در موکوس تولید شده به دام می افتند و از ریه به بیرون دفع می شوند.

گاهی اوقات، مانند زمانی که یک عفونت در ریه وجود دارد، موکوس بیش از حد تولید می شود و بدن با سرفه تلاش می کند این خلط فراوان را دفع کند. هنگام مراجعه به پزشک، ممکن است آزمایش کشت خلط لازم شود. آزمون کشت خلط با رنگ آمیزی گرم، برای شناسایی باکتری عامل **عفونت**، انجام می شود.

روش انجام اسمیر مستقیم خلط جهت تشخیص سل:

نمونه را صبح پس از برخاستن از خواب و پیش از نوشیدن و خوردن مواد غذایی تهیه کنید

دهان را سه مرتبه با آب شستشو دهید.

سعی کنید چند نفس عمیق بکشید.

پس از چند سرفه ، خلط ته حلق را درظرف استریلی که از آزمایشگاه تحویل گرفته اید، جمع آوری نمایید.

به یاد داشته باشید که خلط باید توسط سرفه از ریه کنده شود و بزاق دهان مورد نظر نمی باشد.

پس از نمونه گیری درب ظرف را محکم بسته و نمونه را داخل دو کیسه پلاستیکی که در اختیار شما قرارداده می شود ، حداکثر تا یک ساعت به آزمایشگاه انتقال دهید.

توجه داشته باشید که در صورت عدم رعایت موارد یاد شده و مشکوک بودن نتیجه، تکرار نمونه و آزمایش ضروری خواهد شد.

آزمایش آدنوزین د آمیناز جهت تشخیص سل:

فعالیت آنزیمی در بیماران توبرکلوز نسبت به سایر بیماری های تنفسی کودکان بسیار بالاتر است. بنابراین این آنزیم در تشخیص سل نیز کاربرد دارد. افزایش آنزیم در جریان عود مجددی سارکوئیدوز مزمن مشاهده می شود. در بیماری های مجاری صفراوی پایین و **بیماری های مزمن کبدی** همیشه بالاست. اگر ADA به صورت واضح در مایع پلور فردی با علائم توبرکلوزیس افزایش داشته باشد احتمال دارد فرد مبتلا به عفونت مایکو باکتریوم توبرکلوزیس در پلور باشد. این موضوع بەویژه وقتی مصداق دارد که شیوع توبرکلوزیس در محل سکونت فرد، بالا باشد.

وقتی میزان شیوع TB در یک منطقه پایین است، ابتلای فرد به TB یا افزایش سطح ADA ممکن است به دلایل دیگری باشد مانند کانسر (بویژه لنفوما)، سارکوئیدوزیس، یا لوپوس.

روش انجام آزمایش آنزیم آدنوزین د آمیناز جهت تشخیص سل:

این آزمایش با نمونه گیری خون انجام می شود. پس از نمونه گیری با روش های **سرولوژی** این آنزیم اندازه گیری و گزارش می شود.

مقادیر طبیعی آنزیم آدنوزین د آمیناز:

سرم : ۱۵ -۰ واحد در لیتر(U.L)

مایعات بدن : ۳۰ -۰ واحد در لیتر(U.L)

مایع CSF : ۹ – ۰ واحد در لیتر(U.L)

آزمایش PCR جهت تشخیص سل MTB (Mycobacterium tuberculosis)

امروزه روش های مولکولی PCR کیفی و کمی (Real time PCR) به عنوان روشی با اختصاصیت و حساسیت بالا برای تشخیص سل ابداع شده است که می تواند کمک شایانی به تشخیص به موقع و انجام اقدامات درمانی مناسب نموده است. پیشرفت هایی که درباره شناسایی ساختار ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صورت گرفته است به گسترش پروبهای ژنی و روشهای تکثیر ژنی برای شناسایی و جدا کردن باسیل توبرکلوز از کشت یا نمونه های مختلف بالینی کمک کرده است و همچنین جدا سازی مولکولی سوش های مقاوم به دارو را میسر نموده است.

در این آزمایش نمونه های مایعات بدن نظیر مایع مغزی نخاعی(CSF) ، مایع مفصلی، مایع BAL (Bronchoalveolar lavage fluid) و مایع صفاقی، نمونه خلط، ترشحات برونش ها ، مدفوع، بافت، استخوان، مغز استخوان و **ادرار** مورد آزمایش قرار می گیرند.

توجه داشته باشید که:

استفاده از تکنیک های مولکولی و آماده شدن نتایج آن در زمان کوتاه کمک زیادی به تشخیص زود هنگام و به موقع بیماری، انجام اقدامات درمانی مناسب و کاهش انتقال بیماری نموده است.

با استفاده از روش های مولکولی موتاسیون های مقاومت دارویی برای داروهایی مانند ریفامپین می تواند در عرض چند ساعت مشخص شود.

روش های مولکولی امکان انتخاب درمان کاملا اختصاصی را مهیا نموده است.

بعد از **نمونه گیری**، نمونه تا زمان انجام مراحل استخراج DNA باید در یخچال نگهداری شود ولی برای نگهداری نمونه به مدت طولانی تر باید آن را در دمای ۲۰ -°C نگهداری نمود.

نمونه باید در شرایط سرد حمل و در کوتاه ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ارسال شود.

آزمایش ادرار جهت تشخیص سل:

برای تشخیص سل ممکن است درخواست نمونه ادرار شود. برای انجام این آزمایش بتدا باید محل خروج ادرار را با آب و صابون به خوبی شستشو دهید . نمونه وسط ، اولین ادرار صبحگاهی جهت آزمایش مناسب می باشد. معمولاً حداقل 3 نمونه ادرار صبحگاهی در سه روز متفاوت در ظروف استریل جداگانه توصیه شده توسط آزمایشگاه ، جهت بررسی وجود میکروب سل نیاز می باشد . به دلیل این که آنتی بیوتیک ها باعث مهار رشد میکروب سل در ادرار می شوند ، مناسب است که بیمار قبل از دادن نمونه آنتی بیوتیک مصرف نکرده باشد.

نمونه هایی که کمتر از 40 میلی لیتر بوده و یا بیش از 24 ساعت نگهداری شده باشند برای کشت مناسب نخواهند بود.

رادیوگرافی ریه ها جهت تشخیص سل:

جهت تشخیص سل گاهی اوقات لازم است از ریه های فرد عکس برداری شود. همان طور که قبلا هم اشاره شد سل بیماری می باشد که ریه ها را درگیر می کند. در این بیماری ریه ها دچار عفونت و پنومونی می شود. عفونت در ریه ها در رادیوگرافی در اغلب موارد مشخص می شود و به صورت نکات سفید رنگی مشخص می شود .بنابراین با انجام رادیوگرافی از ریه ها می توان به وجود عفونت در ریه ها پی برد.

تشخیص اعتیاد:

پذیرش

نکاتی که در مرحله پذیرش مراجعین جهت انجام آزمایش تشخیص اعتیاد به مواد مخدر می‌باید موردنظر قرار گیرد به شرح ذیل می‌باشد.

- ✓ ارائه معرفی‌نامه عکس‌دار و ممهور به مهر دفترخانه ازدواج، دادگاه‌ها، نیروی انتظامی، کارگزینی ادارات، شرکت‌ها و اتحادیه‌های صنفی که به نحوی دارای مجوز قانونی جهت فعالیت می‌باشند.
- ✓ ثبت مشخصات مراجعین ، شماره نامه ، تاریخ معرفی‌نامه و ارگان ارجاع دهنده در سیستم نرم‌افزاری رایانه‌ای و ارائه قبض جوابدهی با تاریخ مشخص.
- ✓ تائید هویت افراد توسط مسئول نمونه گیری با معرفی‌نامه ارائه شده.
- ✓ ثبت شماره پذیرش ویا کد بر روی ظرف نمونه‌گیری.
- ✓ معرفی نامه ها، دفتر ثبت مشخصات مراجعین، جوابهای ثبت شده در کامپیوتر حد اقل تا دوسال نگهداری شوند.

آمادگی مراجعه کننده برای آزمایش

باید فرد نمونه دهنده در حد اقل سه روز قبل از آزمایش از مصرف قرصهای کدئین دار خود داری نمایدو در صورت امکان (در صورتی که برای سلامتی وی خطری ایجاد نکند) از مصرف داروهای سایمتیدین، رانیتیدین و ... خود داری کرده ویا مصرف آنها را به آزمایشگاه اطلاع دهد.

مکان نمونه‌گیری

محل نمونه‌گیری از مهمترین قسمت‌های آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر می‌باشد و در صورت رعایت استانداردها می‌تواند موجب منزلت ارباب رجوع ، سهولت و دقت در نمونه‌گیری را فراهم آورد و باعث جلوگیری از بروز بسیاری از مداخلات (تقلبها) در هنگام نمونه گیری شود. در نتیجه محل نمونه‌گیری بایستی دارای خصوصیات ذیل می باشد:

- ✓ بخش نمونه گیری ادرار از نور و تهویه کافی برخوردار باشد.
- ✓ محلی مجزا از سرویسهای بهداشتی عمومی و فقط مختص نمونه‌گیری آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر باشد.
- ✓ کف و دیوار های محل نمونه گیری قابل شستشو و بهداشتی باشد.
- ✓ ترجیها جهت جلوگیری از آلودگی ناشی از ترشحات ادرار در هنگام نمونه‌گیری آقایان از سرویس‌های بهداشتی دیواری استفاده شود.

- ✓ استفاده از سیستم مدار بسته جهت نظارت بر نمونه‌گیری به منظور حفظ بیشتر شئونات اخلاقی و اسلامی در اولویت قرار دارد.
- ✓ دوربین‌ها بایددر محل نمونه‌گیری به گونه ای نصب شوند که بهترین دید را داشته و نقطه کور نداشته باشد.
- ✓ ترجیها از ظروف در پیچ دار جهت نمونه گیری استفاده شود تا امکان اضافه نمودن مواد به آن به حد اقل برسد. (در فاصله زمانی ماندن نمونه در محل نمونه‌گیری و انتقال آن).
- ✓ امکان دسترسی افرادمتفرقه درمحل نمونه‌گیری به نمونه های گرفته شده وجود نداشته باشد.
- ✓ ترجیها مکان نمونه گیری در نزدیکترین فاصله به محل انجام آزمایش باشد.

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری ادرار جهت آزمایش مواد مخدر از اهمیت زیادی برخوردار بوده و باید در حضور ناظر مستقیم معتمد و یا تحت نظارت دوربین‌های مدار بسته صورت گیرد، مانیتور باید در محلی محفوظ قرار داده شود که بجز پرسنل مسئول از ورود و رویت افراد غیرمسئول جلوگیری شود تا منزلت مراجعین حفظ گردد.

- ✓ یک ظرف در پیچ‌دار پلاستیکی یکبار مصرف که با کد و شماره مشخص گردیده به فرد مورد آزمایش داده شود.
- ✓ نمونه گیر باید مشخصات فرد را با برگه معرفی‌نامه مطابقت نماید. (صلاحیت اخلاقی و امین بودن نمونه گیر باید توسط مسئول آزمایشگاه به اثبات رسیده باشد).
- ✓ درصورت هرگونه شک به فرد نمونه دهنده استفاده از روشهای پیشگیری از تقلب مانند بازرسی بدنی، شستشوی دستها پیش از نمونه گیری، و غیره نیز توصیه می شود.
- ✓ در محل نمونه‌گیری حتماً جالباسی نصب باشد تا نمونه دهنده وسایل اضافی مانند پالتو، کت و کیف خود را در آن قرار دهد و با خود به محل نمونه‌گیری نبرد.
- ✓ مایع صابون و آب در محلی باشد که امکان افزودن آن به نمونه وجود نداشته باشد.
- ✓ نمونه گرفته شده بلافاصله باید توسط ناظر از نمونه دهنده تحویل گرفته و به مکان مناسب و مطمئن انتقال داده شود. تاامکان جا بجایی و یا افزودن مواد خارجی به نمونه وجود نداشته باشد.
- ✓ نمونه‌گیر باید مطمئن شود که نمونه مستقیماً از فرد نمونه دهنده، به داخل ظرف نمونه‌گیری ریخته شود.
- ✓ نمونه‌ها تا قبل از انجام آزمایش و تحویل به آزمایشگاه می‌باید زیرنظر نمونه‌گیربوده و امکان دسترسی افراد متفرقه به آن وجود نداشته باشد. بدیهی است ناظر نمونه گیری باید در تمام مراحل مراقب هر گونه تقلب احتمالی اعم از افزودن مواد به نمونه، جاسازی نمونه و ... باشد.

مراحل بعد از نمونه‌گیری

نمونه‌گیر باید مطمئن شود حجم نمونه ادرار جهت انجام آزمایش غربالی و تائیدی (جهت انجام آزمایش کروماتو گرافی) کافی باشد و حجم آن دو برابر مقدارمورد نیاز برای آزمایش کروماتو گرافی باشد تادر صورت نیاز به تکرار آزمایش ، امکان تکرار با آن نمونه وجود داشته باشد.

- ✓ درصورت شک به نحوه نمونه گیری ، بهتر است دمای نمونه توسط دماسنج دیجیتالی اندازه‌گیری و ثبت شود، این عمل باید حداکثر تا 4 دقیقه پس از نمونه‌گیری انجام شده و دمای نمونه باید بین 33 تا 37 درجه باشد. در غیر این صورت باید نمونه گیری تکرار شود.
- ✓ رنگ، شفافیت، pH و وزن مخصوص نمونه بررسی شود و اگر نمونه‌ای مشکوک به تقلب است، نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

در مورد نمونه های خیلی رقیق باید وزن مخصوص نمونه اندازه گیری شود و در صورتی که وزن مخصوص آن کمتر از 1.004 باشد ،نمونه گیری تکرار گردد.

- ✓ نمونه هایی‌که غلظت کراتینین آنهاکمتر از 20mg/dl باشند، بایدمجدداً نمونه گیری شوند.
- ✓ pH مورد انتظار نمونه ادرار در حد 4/5 – 8/5 قابل قبول می‌باشد (در صورتیکه pH نمونه کمتر یا بیشتر از مقدار مذکور باشد باید توسط سود نرمال و یا اسید کلریدریک نرمال به محدوده مورد انتظار رسیده وبه منظور جلوگیری ازتداخل موادی که باعث تغییر pH می گردند باید نمونه فقط باروش **کروماتوگرافی** مورد آزمایش قرار گرفته و نتیجه تایید گردد.
- ✓ نباید مواد اضافی مانند مواد نگهدارنده به نمونه اضافه شود.
- ✓ نمونه‌های دریافتی از مراکز قضائی و انتظامی می‌بایدبصورت مهر و موم شده باشد. بطوریکه دسترسی به نمونه ادرار تا مرحله آزمایش امکان‌پذیر نباشد و نمونه‌گیر وفرد تحویل دهنده نمونه باید برگه درخواست را امضاء نمایند و این نمونه‌ها باید قبل از تحویل توسط

آزمایشگاه از نظر رنگ، pH و وزن مخصوص و ...کنترل و پس از تائید از مأمور تحویل گرفته شود.

- ✓ بر روی نمونه‌ها برچسب چسبانیده شود و برچسب باید دارای نام و یا کد مشخص کننده فرد آزمایش شونده و همچنین تاریخ، زمان نمونه‌گیری و حجم تقریبی نمونه باشد.
- ✓ در صورت مثبت شدن نتیجه آزمایش غربالی، می بایست نمونه ادرار مشکوک بصورت محفوظ (غیرقابل دسترسی برای افراد متفرقه) در یخچال و یا فریزر جهت انجام آزمایش تاییدی نگهداری شود.

نگهداری نمونه‌ها

برای نگهداری نمونه‌ها تا 5 روز، فریزر با دمای 5- درجه سانتی‌گراد مناسب می باشد ولی برای مدت طولانی‌تر از دمای 20- درجه استفاده می‌شود و باید از یخ زدن و ذوب شدن‌های متوالی نمونه‌ها پرهیز نمود زیرا باعث تغییر مواد موجود در نمونه‌هامی‌شود.ظروف نگهداری نمونه بسته به نوع ماده مورد آزمایش متفاوت می‌باشد . همچنین نمونه‌ها باید دور از نور و حرارت نگهداری شود . درمورد نگهداری طولانی مدت نمونه‌های ادرار حاوی مرفین و کدئین ظرف پلاستیکی و دمای 20- درجه سانتی گراد مناسب است.

مشخصات برگه نتیجه آزمایشگاه

- ✓ ترجیحاً باید نتایج بصورت پرینت کامپیوتری ارائه گردد.
- ✓ نام و نشانی آزمایشگاه و شماره تلفن آن بر روی برگه جواب درج شود.
- ✓ نام سازمان درخواست کننده، شماره معرفی‌نامه و تاریخ آن بر روی برگه جواب درج شود.
- ✓ تاریخ انجام آزمایش و شماره پذیرش کامپیوتری و یا شماره سریال بر روی برگه جواب درج شود.
- ✓ در زیر نویس برگه نتایج آزمایش تاکید شود که چه داروها و مواد مخدری مورد آزمایش قرار گرفته است.
- ✓ مدت اعتبار نتیجه آزمایش (یک ماه از تاریخ صدور) بر روی برگه جواب درج شود.
- ✓ امضاء مسئول آزمایشگاه بر روی برگه جواب موجود باشد.
- ✓ ممهور بودن نتایج آزمایشها با مهر برجسته و ذکر اینکه نتایج آزمایشها بدون مهر برجسته فاقد اعتبار می‌باشد.

مهر برجسته باید دارای مشخصات کامل آزمایشگاه شامل: آرم دانشگاه، نام کامل دانشگاه مربوطه، نام کامل آزمایشگاه ونیز عنوان بخش تشخیص مواد مخدر باشد.

مهرهای آزمایشگاه انحصاراً باید دراختیار مسئول آزمایشگاه موادمخدر و یا فرد مورد اطمینان وی بوده و تحت نظارت فرد مذکور نتایج مهر شده و سپس در محل امن (کمد یا کشوهای قفل‌دار) نگهداری شود.

روشهای تشخیص مواد مخدر

روشهای رایج برای تشخیص مواد مخدر عبارتنداز:

1. **روشهای شیمیایی**
2. **روشهای کروماتوگرافی**
3. **روشهای ایمونولوژیک**

1- روشهای شیمیایی

روشهای شیمیایی از قدیمی‌ترین روشهای شناسائی آلکالوئیدها بخصوص مرفین می‌باشند. اساس این روشها برمبنای انجام واکنش شیمیائی یک معرف با مرفین است که به صورت آزاد در حاصل استخراج وجود دارد. برای انجام آزمایش ابتدا باید مرفین را از مایع بیولوژیک استخراج نمود. دو معرف مورداستفاده معرف‌های فرود و مارکی است .

2- روشهای کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یکی از معمول‌ترین روشهای اندازه‌گیری کیفی و کمی داروها در مایعات بیولوژیک است.همه انواع کروماتو گرافی دارای اجزای زیر هستند.

فاز متحرک (Mobile phase) که مایع و یا گاز می باشد.

فاز ثابت (Stationary phase)که می تواند مایع ویاجامد باشد.

به طور کلی فاز متحرک به دلیل جریانی که دارد از کنار یا درون فاز ثابت عبور می کند و بر اساس تمایل اجزای مختلف نمونه مورد نظر باسرعتهای مختلف توسط فاز متحرک شسسته می شوند. اگر ماده مورد آنالیز تمایل کمتری به فاز ثابت داشته باشد در نتیجه سریعتر توسط فاز متحرک شسته می شود و اگر بیشتر به فاز ثابت تمایل داشته باشند باسرعت کمتر شسته می شوند و به این ترتیب مواد از هم تفکیک می شوند.به عبارت دیگر اجزاء مختلف نمونه بر اساس اینکه با چه شدتی توسط فاز ثابت نگهداشته می شوند از هم جدا می گردند.

از انواع کروماتوگرافی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- کروماتوگرافی روی کاغذ Paper Chromatography (PC)
- کروماتوگرافی روی لایه نازک (Thin Layer Chromatography (TLC
- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- کروماتوگرافی گازی Gas Chromatography (GC)

2-1-کروماتوگرافی روی کاغذ Paper Chromatography (PC)

در این نوع کروماتو گرافی پس از استخراج ماده مورد آنالیز آن رادر حلال مناسب حل کرده و روی کاغذ لکه گذاری می کنیم. سپس آن را داخل تانک قرار می دهیم که در آن فاز متحرک قرار دارد. به دلیل کشش سطحی حلال روی سطح کاغذ بالا آمده و اجزاء مختلف بر اساس حلالیت و تمایل شان به فاز ثابت در محلهای مختلف باقی می مانند. هرچه اجزاء مخلوط بیشتر در حلال

حل شوند روی سطح کاغذ بیشتر بالا می روند. و به این ترتیب از هم جدا می گردند. در مرحله بعد باید سپس بایستی با معرف مناسب لکه هارا ظاهر و قابل دید نمود.

2-2-کروماتوگرافی بر روی لایه نازک TLC

این روش ساده ترین و مفید ترین روش تشخیص اولیه و خلوص مواد است. در این روش فاز ثابت روی یک صفحه از جنس پلیمر یا آلومینیوم کشیده می شود .که جنس فاز ثابت ترکیباتی نظیر سیلیکاژل ویا آلومینا می باشد. در این نوع کروماتو گرافی پلاریته اهمیت زیادی دارد.روش کار مانند کروماتو گرافی کاغذ می باشدو بطور خلاصه شامل مراحل ذیل است:

استخراج دارو ویا ماده مورد آنالیز از ادرار بوسیله حلال آلی، تغلیظ حاصل استخراج و حل کردن آن در یک حلال آلی ، لکه‌گذاری روی صفحه TLC، جداسازی ترکیبات بوسیله فاز متحرک، ظهور و شناسایی داروهای تفکیک شده توسط معرف‌های شیمیایی شناخته شد، استفاده از RF (نسبت حرکت نمونه مورد آنالیز روی صفحه TLC به حرکت جبهه فاز متحرک)، استفاده از جذب UV یا فلورسانس. توجه به نکاتی مثل خصوصیات فاز متحرک، فاز ثابت، اشباع بودن یا نبودن تانک کروماتوگرافی در جداسازی و شناسایی دارو مؤثر است.

2-2-1- مزایای TLC

- ساده ترین و مفید ترین روش تشخیص اولیه و خلوص مواد است. موادی که به هنگام لکه‌گذاری بر روی صفحه قرار داده می‌شوند، پس از تفکیک شدن بر روی آن باقی مانده و در نهایت در صورت بکارگیری آشکار سازهای مناسب، قابل شناسایی و مشاهده خواهند بود.
- کاربرد ساده داشته و نیاز به تجهیزات اندک دارد.
- قابلیت جداسازی و شناسایی مقادیر ناچیزمواد را دارا می باشد.
- زمان انجام آزمایش کوتاه است.
- می توان چندین نمونه را هم زمان آزمایش کرد.
- از فازهای ثابت و متحرک متنوع می توان استفاده نمود.
- از معرفهای ظاهر کننده متنوع می توان استفاده نمود.

2-2-2- معایب TLC

- حساسیت آن کمتر از روشهای GC,GC/MS,HPLC می باشد.
- دقت وصحت آن کمتر از روشهای فوق می باشد.

2-3- گاز کروماتو گرافی (GC)

در روش گازکروماتو گرافی فاز متحرک گاز است. ماده مورد آنالیز تحت فشار گاز در طول ستون کروماتو گرافی که توسط ذرات فاز ثابت پر شده

است، حرکت کرده وبر اساس پلاریته با سرعتهای متفاوتی در طول ستون حرکت می کنند ودر نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و توسط آشکار ساز (Detector) شناسایی می شود.

این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. روش کلی کار عبارتست از استخراج دارو با یک حلال مناسب، تغلیظ حاصل استخراج و تبدیل آن به یک مشتق فرار (مشتق‌سازی)، تزریق به دستگاه گاز کروماتوگراف، عبور فاز متحرک گازی به همراه نمونه مورد آنالیز از ستون و بالاخره، شناسایی و ثبت توسط آشکارساز.

معمولاً به منظور افزایش حساسیت، دقت و صحت دستگاه گاز کروماتوگراف،آن را به طیف سنج جرمی متصل می کنند که به آن (GC/MS) می گویند.این روش ، روش مرجع برای تشخیص بسیاری از دارو ها، مواد مخدرو مواد مورد آنالیز می باشد.

با توجه به اینکه این روشها گران بوده و استفاده از آنها نیاز به تخصص دارد.بعلاوه نیازمند خدمات مناسب بعد از فروش می باشد،لذا مواردی از این قبیل استفاده از این سیستمها رادچار محدودیت میکند. از اینرو از روشهای ساده تر و کاربردی دیگری که در عین حال از حساسیت و دقت مناسب برخوردار باشند (نظیر TLC) استفاده می شود.

4-2-کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

در روش کروماتو گرافی مایع با کارایی بالا فاز متحرک مایع است. ماده مورد آنالیز تحت فشار پمپ در طول ستون کروماتو گرافی که توسط ذرات فاز ثابت پر شده است حرکت کرده وبر اساس پلاریته با سرعتهای متفاوتی در طول ستون حرکت می کنند در نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و توسط آشکار ساز (Detector) شناسایی می شود. این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردارمی باشد. روش کلی کار در HPLC شامل مراحل زیر است:

استخراج با یک حلال مناسب، تزریق حاصل استخراج به دستگاه و حرکت آن به همراه فاز متحرک مناسب با فشار بالا به داخل ستون ، تفکیک آن و بالاخره تشخیص بوسیله آشکار ساز واندازه گیری ترکیبات مورد نظر براساس سطح زیر منحنی پیک‌های بدست آمده می باشد. امروز توسعه و تجهیز HPLC منجر به ساخت دستگاههای کاملاً خودکار و منعطف برای سیستم‌های مختلف شده است. این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است.

3- روشهای ایمونولوژیک

همه این روشها براساس اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی می باشد. از آنجاییکه در حال حاضربه منظور آزمایشهای غربالی تشخیص مواد مخدر در ادرار فقط از روش ایمونوکروماتو گرافی استفاده می شود ، فقط به شرح آن می پردازیم وبه ذکر نام تعدادی از سایر روشها اکتفا می کنیم:

-RIA رادیوایمونواسی (Radioimmunoassay)

-FIA فلوئورسانس ایمونواسی (Flurescentimmunoassay)

-EIA (Enzymeimmunoassay) که این سیستم خود شامل EMIT و ELISA می‌باشد.

- ممانعت از آگلوتیناسیون (Agglutination Inhibition)

- روش ایمونوکروماتوگرافی(Immunochromatography)

روش ایمونوکروماتوگرافی(Immunochromatography)

روشی که در حال حاضر در کشور به طور وسیعی برای آزمایشهای غربالگری تشخیص اعتیادبه مواد مخدر مورد استفاده قرار می گیرد، روش ایمونو کروماتو گرافی می باشد. این روش یک روش ایمونواسی رقابتی بر روی نوارهای غشایی است . در این روش با قرار دادن ادرار بر روی نوارهای غشایی که دارای آنتی‌بادی ضد مرفین است نمونه را مورد بررسی قرار می‌دهند. رقابت میان مرفین و مرفین کونژوگه صورت می‌گیرد که تشکیل خط رنگی نشانگر اتصال کونژوگه مرفین و عدم حضور مرفین در ادرار است.این روش نیز باوجود حساسیت زیاد، با برخی داروها مانند کدئین نتایج مثبت کاذب ایجاد می‌کند .

نحوه آزمایش تشخیص مواد مخدر درادرار

آزمایشهای داروهای اعتیادآور و غیرمجاز در دو مرحله اجرا می‌شود. اولین مرحله شامل آزمایش غربالی و یا آزمایشهای اولیه است که برای تشخیص و تفکیک نمونه‌های منفی از نمونه‌های مثبت احتمالی انجام می‌گردد.دومین مرحله آزمایشهای تائیدی برای اثبات شناسایی دارو یا متابولیتهای آن است

که احتمال وجود آنها در مرحله غربالی مشخص شده است.
روشهای متنوعی جهت غربالگری اولیه و نیز روش‌های تائیدی وجود داشته که با توجه به امکانات و دسترسی و هزینه‌های تجهیزاتی، دو روش متداول در آزمایشگاههای مراکز بهداشتی- درمانی جهت غربالگری اولیه و تائیدی انجام می‌پذیرد که شامل روش ایمونوکروماتوگرافی (غربالگری سریع) و روش کروماتوگرافی روی لایه نازک TLC می‌باشد.
کیتهای تشخیص مرفین به روش الایزا نیز ارائه شده است که در آینده ممکن است مورد استفاده قرار گیرد.

1- کیت تشخیص مرفین در ادرار به روشTLC

این کیت به صورت تجارتی موجود می باشد. برای استفاد از این کیت به دستور العمل مربوطه مراجعه شود.

2- استخراج مرفین به روش مایع – مایع Liquid –Liquid Extraction(LLE)

در صورت عدم دسترسی به کیت مذکور می توان از روش TLCبا استخراج مایع – مایع استفاده نمود که در ذیل به آن اشاره شده است:

1. 20 میلی لیتر نمونه با 2 میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ مخلوط شده و به مدت یک ساعت در بنماری جوش ، و یا 24 ساعت در دمای آزمایشگاه قرار میدهیم .
2. توسط سود غلیظ نمونه قلیایی شده و PH = 8.5 – 9 تنظیم شود.
3. عمل استخراج توسط محلول کلروفرم : 2- پروپانل به نسبت 1:9 انجام شود. با این ترتیب که نمونه ادرار قلیایی شده را داخل قیف دکانتور ریخته و با 40 میلی لیتر محلول استخراج (کلروفرم : 2- پروپانل به نسبت 1:9) مخلوط کرده و به شدت هم می زنیم. سپس مدتی صبر می کنیم تا دولایه شود. لایه زیری را از کاغذ صافی عبور داده و داخل بشر جمع آوری می کنیم و توسط بنماری جوش آن را تبخیر می کنیم.پس از خنک شدن بشر، محتوای آن را در 4-3 قطره متانل حل کرده و روی صفحه TLC لکه گذاری می کنیم.
   - ✓ پلیتهای TLC باید در دمای 110- 80 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه فعال شود.
4. فاز متحرک شامل کلروفرم(12ml), متانل(1.4ml), آمونیاک(0.2ml) آماده شود. (از فاز های متحرک دیگری هم می توان استفاده کرد ولی باید به این نکته توجه نمود که تداخلی بین مرفین ، کدئین و سایر داروها وجود نداشته باشد.)
5. پس از 30- 25 دقیقه از داخل تانک خارج میکنیم.چند دقیقه صبر می کنیم تا سطح پلیت خشک شود آنگاه حدود 8 دقیقه در دمای 110- 80 درجه سانتی گراد قرار می دهیم.
6. با استفاده از معرف یدو پلاتینات لکه های ایجاد شده را ظاهر می کنیم و پلیت را تفسیر می کنیم.

مواردی از منابع خطا

- ✓ در صورت غلظت کم دارو و در محدوده cutoff (300 ng/ml) ممکن است نتیجه تست نواری مشکوک تلقی گردد که در این گونه موارد باید نمونه با روش تائیدی کنترل شود.
- ✓ از مخلوط نمودن نمونه‌ها برای انجام آزمایش بعنوان یک نمونه جداً پرهیز گردد. در غیر اینصورت با رقیق شدن نمونه مثبت، مقدار دارو از غلظت حد مرزی کمتر گردیده و نتیجه به غلط منفی گزارش می‌گردد.
- ✓ در روش TLC از آنجائیکه به تجربه و مهارت فرد آزمایش کننده بسیار وابسته است، توصیه می‌گردد از افراد باتجربه و آموزش دیده استفاده گردد.
- ✓ در روش TLC باید کلیه مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام گیرد و زمانهای ذکر شده برای هر مرحله رعایت گردد.
- ✓ کنترل میزان خلا پمپ (در محدوده 0.05-0.3Bar) مورد استفاده در مرحله استخراج TLC باید در هر سری کاری تنظیم شود .
- ✓ سرعت حرکت بافرها و تخلیه نمونه ادرار از ستونهای کروماتو گرافی بایستی مطابق دستور العمل کیتهای مورد استفاده باشد.
- ✓ دمای هات پلیت در محدوده 80- 110درجه سانتی گراد تنظیم شود.
- ✓ زمان اشباع شدن تانک کروماتو گرافی حدود 45- 60 دقیقه رعایت شود.
- ✓ زمان لازم برای خواندن نتایج پلیت TLC (حدود یک ساعت) رعایت شود. و سپس به منظور نگهداری طولانی مدت سطح آنها با یک صفحه شیشه ای پوشانیده شود.
- ✓ بشرهای استفاده شده بعد از اتمام آزمایش باید اسید واش شوند.

- ✓ برای انجام آزمایش TLC باید مشخصات نمونه با ذکرتاریخ در دفتر جداگانه‌ای ثبت گردیده سپس روی پلیت TLC کد گذاری و آزمایش گردد. همچنین پس از انجام آزمایش،روی پلیت‌ها تاریخ آزمایش ثبت گردیده و مدت یکسال نگهداری شود.
- ✓

رعایت اصول ایمنی در آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر

درآزمایشگاه تشخیص مواد مخدر باید کلیه اصول ایمنی جزوه " اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان " رعایت گردد. در ذیل به نکاتی چند اشاره می شود:

- ✓ هنگام کار از روپوش ، دستکش، ماسک و عینک استفاده شود.
- ✓ پس از انجام آزمایش با مواد ضد عفونی کننده مناسب (هیپوکلریت سدیم) سطوح کار ضد عفونی شود.
- ✓ از پوار و پیپت فیلربرای برداشتن محلولها توسط پی پت استفاده شود.
- ✓ مواد ضد عفونی کننده مناسب وظروف Safety box در دسترس باشد.
- ✓ با توجه به بخارات شیمیائی حاصل از مواد شیمیایی استفاده شده در روش TLC ، لازم است کلیه مراحل آزمایش در زیر هودقوی انجام گردیده و به منظور حفاظت و ایمنی پرسنل از دستکش و ماسک استفاده نمایند.
- ✓ ستونهای کروماتو گرافی ، نوار و یا کاست کیتهای غربالی استفاده شده بعد از اتمام آزمایش به روش بهداشتی دفع گردد.
- ✓ کلیه وسایلی که به هنگام آزمایش با ادرار آغشته شده است با ماده ضد عفونی کننده مناسب (محلول سفید کننده خانگی با کلرفعال % 5که به نسبت یک به ده رقیق گردیده) ، ضد عفونی و سپس شسته شود.
- ✓ درون محفظه خلا در هنگام آزمایش TLC مقداری محلول ضد عفونی کننده اضافه شود. برای جلوگیری از پخش آئروسل در فضا بایستی آزمایش زیر هود انجام شود.
- ✓ بخش نمونه گیری ادرار کاملا تمیز وضد عفونی شود.
- ✓ نمونه گیر از دستکش استفاده کند.

فضای فیزیکی

با توجه به تعداد قابل توجه مراجعین به آزمایشگاههای تشخیص اعتیاد به موادمخدر در مراکز بهداشتی- درمانی که عمدتاً از مراجعین ازدواجی و استخدامی وغیره می‌باشند، حتی‌المقدور باید فضای مناسب و امکانات رفاهی مناسب جهت مراجعین فراهم گردد.

- ✓ سالن انتظار به ازاء هر مراجعه کننده حداقل نیم مترمربع باشد.
- ✓ سرویس بهداشتی مخصوص نمونه‌گیری آقایان (متناسب با تعداد مراجعین) وجود داشته باشد.
- ✓ سرویس بهداشتی مخصوص نمونه‌گیری خانم‌ها (متناسب با تعداد مراجعین) وجود داشته باشد.
- ✓ فضای فیزیکی آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به موادمخدر (غربالگری و TLC) حد اقل 20 مترمربع باشد.
- ✓ فضای فیزیکی مربوط به سیستم مانیتور مدار بسته و کنترل هویت مراجعین حد اقل3 مترمربع باشد.
- ✓ ترجیحاً فضاهای مربوط به نمونه‌گیری و انجام آزمایش تشخیص اعتیاد به موادمخدر جهت انتقال آسان نمونه‌ها و حفاظت و ایمنی بیشتر در مجاورت همدیگر باشد و به هم ارتباط داشته باشد.

تجهیزات بخش تشخیص موادمخدر

- سیستم سخت‌افزاری و نرم‌افزاری آزمایشگاه تشخیص موادمخدر
- سیستم مدار بسته جهت نظارت بر نمونه‌گیری
- دماسنج دیجیتالی
- pH متر
- رفراکتومتر
- سانتریفوژ

- هات پلیت
- پمپ خلا
- هود معمولی با قدرت تهویه مناسب
- یخچال و فریزر
- سینک بزرگ
- کابینت آزمایشگاهی با عرض حد اقل 60 سانتیمتر به متراژ حداقل 7 مترمربع

کنترل و نگهداری تجهیزات

کنترل کیفی ابزار پایه مورد استفاده در بخش تشخیص موادمخدر باید بصورت دوره‌ای انجام گردیده و مستندات آن در آزمایشگاه موجود باشد.(برای اطلاع بیشتر به جزوه کنترل کیفی ابزار پایه تدوین شده توسط آزمایشگاه مرجع سلامت مراجعه شود.)

- ✓ پمپ خلا (در محدوده 0.05-0.3 Bar) هر شش ماه یک بار کالیبره شود.
- ✓ دمای هات پلیت در محدوده 80- 110 درجه سانتی گراد تنظیم شود ودر فواصل زمانی شش ماه کالیبره گردد.

اصول کنترل کیفیت در آزمایشگاه بیوشیمی

مدیریت فراگیر کیفیت در آزمایشگاه

اجرای برنامه کنترل کیفیت سیستمی برای فراهم آوردن سطح مطلوبی از کیفیت نتایج آزمایش می باشد. این سیستم برای کشف، کاهش و تصحیح نقص های موجود در فرایند آزمایش در داخل آزمایشگاه طراحی می شود. با انجام کنترل کیفیت در مرحله آزمایش می توان متوجه شد که آیا میزان خطای موجود در روش های آزمایشگاهی به کار رفته در آزمایشگاه، قابل قبول است یا خیر. بنابراین یک برنامه کنترل کیفیت باید دارای قدرت بالا و کافی برای تشخیص خطا باشد و در عین حال باید نسبت به سطوح خطای قابل قبول غیرحساس باشد یا به عبارتی دیگر باید میزان رد کاذب (false rejection) آن ناچیز باشد.

خطاها از نظر زمانی به سه دسته تقسیم می شوند: قبل از آزمایش، حین آزمایش، پس از آزمایش

با توجه به این که بسیاری از خطاهای آزمایشگاهی مربوط به خطاهای قبل و پس از آزمایش می باشد، مفهوم تضمین کیفیت (quality assurance) به مرور جایگزین برنامه کنترل کیفیت (quality control) گردید.

در مستندات جدید به جای برنامه کنترل کیفیت و تضمین کیفیت، برنامه جامعی به نام مدیریت فراگیر کیفیت (TQM: Total quality management) مورد توجه قرار گرفته است. داشتن برنامه کنترل فراگیر کیفیت، از اشتباهات جلوگیری کرده و از تکرار آزمایش ها و مصرف بی رویه مواد، کیت ها، سرم های کنترل پیشگیری کرده و گزارش آزمایشگاه در موعد مقرر به دست پزشک می رسد.

اصول مدیریت فراگیر کیفیت TQM بر پنج محور استوار است:

1-کنترل کیفیت QC: Quality control

کنترل کیفیت براساس محاسبه آماری بر روی نمونه های سرم کنترل ها صورت گرفته، همچنین شامل کنترل استانداردها، کنترل خطی بودن واکنش و کنترل درجه حرارت اتاق ها، کنترل تجهیزات پایه از جمله سمپلرها، سانتریفوژها، ترازوها، یخچال وفریزرها و تجهیزات تخصصی است. کنترل کیفیت

عمدتا مربوط به پایش فرآیند انجام آزمایش و به ویژه مرتبط با فرآیند اندازه گیری آنالیت در نمونه می شود و ارتباط مستقیم با فرآیندها قبل و بعد از آزمایش ندارد.

2-تضمین کیفیت QA: Quality Assurance

تضمین کیفیت شامل کنترل کیفیت و نظارت و ارزیابی سایر مراحل فعالیت های آزمایشگاهی است که از دریافت نمونه تا ارسال نتیجه را دربرمی گیرد و شامل مراحل پذیرش بیمار، درخواست آزمایش، تصدیق کیفیت جمع آوری نمونه، نگهداری نمونه، انجام آزمایش، گزارش نتایج، تفسیر گزارش نهایی است.

3-فرایندهای آزمایشگاهی با کیفیت (QLP: Quality Laboratory Process)

فرایندهای آزمایشگاهی با کیفیت شامل اجرا و کنترل مقررات آزمایشگاهی، روش کار و نظارت بر همه امور در سیستم مدیریت کیفیت می باشد. به عبارت دیگر با تعیین سیاست های مدیریتی، تدوین روش های اجرایی استاندارد انجام آزمایش (sop)، دستورالعمل های جمع آوری و مدیریت نمونه، دستورالعمل های کاری نحوه اجرای کنترل کیفیت و تفسیر نتایج آنها و دستورالعمل های مربوط به اجرای فرآیند صحه گذاری و تصدیق روش های مورد استفاده با رعایت همه مقررات و مشارکت کلیه کارکنان جهت ارتقای کیفیت خدمات و کسب رضایت ذی نفعان امکان پذیر می گردد.

4-بهبود یا ارتقای کیفیت (QI: Quality Improvement)

در سیستم مدیریت فراگیر کیفیت، باید خطاها و مشکلات آزمایشگاهی ردیابی و شناسایی شده و طوری برنامه ریزی انجام گیرد که از بروز مجدد آنها جلوگیری شود. به عنوان مثال برنامه سیستم مدیریت در یک ازمایشگاه نشان داده که تعدادی از نمونه ها همولیز هستند با بررسی به عمل آمده نشان داده شد که فرد نمونه گیر در دوره آموزشی نمونه گیری شرکت نکرده است، جهت بهبود این مساله کلاس آموزش نمونه گیری تشکیل میگردد.

5-طراحی کیفیت (QP: Quality Planning)

طراحی کیفیت شامل برنامه هایی است جهت ابداع، انتخاب نحوه صحه گذاری روش های مورد استفاده در آزمایشگاه می باشد.

پنج اصل فوق که به آن اصول 5Q نیز گفته می شود باید مرتبط با هم به کار گرفته شوند تا فرآیند کیفیت خدمات در آزمایشگاه ارتقا یابد.

تاریخچه کنترل کیفیت

در سال 2011 میلادی در کارخانه bio-rad در انجمن آزمایشگاه بالینی آمریکا

The American society for clinical laboratory science (ASCLS)

و انجمن شیمی بالینی آمریکا The American Association for clinical chemistry

(AACC) دکتر وستگارد کنترل کیفیت در آزمایشگاه را بیان داشت.

نسل اول کنترل کیفیت با پایه گذاری لوی و جنینگ بود که اولین بارمفهوم کنترل کیفیت آماری

SQC: Statistical quality control به صورت به کارگیری نمونه بیمار و اندازه گیری دوگانه مطرح شد. در ادامه با استفاده از نمونه مخلوط سرمی (pooled) بیماران به عنوان کنترل پایدار و استفاده از نمودار شناخته شده لوی-جنینگ ارتقا یافت. این رویه به صورت استفاده از یک سطح کنترل و محدوده مجاز $\pm 2SD$ تعریف شد.

نسل دوم کنترل کیفیت، در سالهای 1976 تا 1977 استفاده از محدوده $\pm 3SD$ به عنوان محدوده مجاز و محدوده $\pm 2SD$ به عنوان محدوده هشدار، یک رویه استاندارد بود. با توجه به اینکه محدوده $\pm 3SD$ میزان رد کاذب را کاهش می دهد ولی این محدوده در مورد احتمال کشف خطا مناسب نیست، طی دهه 80 تلاش برای تدوین قوانین چندگانه برنامه کنترل کیفیت صورت گرفت و قوانین وستگارد را عمومی ساخت.

نسل سوم کنترل کیفیت، در دهه هشتاد آنالیزورهای کنترل کیفی خودکار نسل جدید بود.

نسل چهارم کنترل کیفیت، تولد مدیریت فراگیر کیفیت با استفاده از کنترل کیفیت آماری و با محوریت مدیریت مسئولیت ها و تعهدات در استقرار کیفیت بود.

نسل پنجم کنترل کیفیت و شش سیگما در دهه90 نیروی قوی برای بهبود طرح کیفیت پدید آورد.

در سیستم کنترل کیفیت *توسط* CLSI موسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی، یک رویه استاندارد کنترل کیفیت در استفاده ازدو سطح (کنترل نرمال و غیرنرمال) به صورت روزانه در هر 24 ساعت در مقابل نسل اول قوانین منفرد کنترل کیفیت لوی- جنینگ در بسیاری از ازمایشگاه ها پذیرفته شد.

در ادامه برای بهبود و ارتقا بیشتر سطح کیفیت آزمایشگاه ها برنامه ارزیابی خارجی کیفیت External quality control: EQC *مورد پذیرش قرار گرفت.*

مفاهیم و واژگان

شاخص های مرکزی و پراکندگی

زمان اندازه گیری یک آنالیت در یک نمونه انتظار می رود که مقادیر مشابهی در هنگام تکرار آزمایش به دست آید ولی در واقعیت این اتفاق رخ نمی دهد. بنابراین لازم است که بعضی محاسبات آماری برای تعیین این میزان تغییرات صورت گیرد و براساس معیارهای موجود مشخص شود که این میزان تغییر قابل قبول است یا خیر. این محاسبات آماری شامل محاسبه میانگین (*mean*)،انحراف معیار(*SD*) و ضریب تغییرات (*CV*) است.

****MEAN** از مجموع داده ها تقسیم بر تعداد آن ها به دست می آید.

$$\text{Mean}=\frac{\sum X_i}{n}$$

**واریانس نشاندهنده مجموع مربعات انحراف داده ها از میانگین است.

**انحراف معیار از ریشه دوم واریانس به دست می آید.

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum(x_i-mean)^2}{n-1}}$$

**ضریب تغییرات (CV): Coefficient of Variation

ضریب تغییرات پارامتر مهمی بوده و به صورت یک مقدار درصدی بیان می شود. CV شاخص مناسبی برای بیان عدم دقت آزمایش است و با کمک فرمول زیر محاسبه می شود.

$$\text{CV} = \frac{SD}{Mean} * 100$$

توجه: به طور کلی این شاخص ها بیانگر پراکندگی داده ها هستند و می توان نتیجه گرفت هر چه این شاخص ها (واریانس، انحراف معیار و ضریب تغییرات) بزرگتر باشند، پراکندگی داده ها بیشتر است و در صورتی که این داده ها حاصل از نتیجه گیری یک ویژگی خاص بر روی نمونه واحد باشد، در این حالت دقت این اندازه گیری کمتر خواهد بود.

معیار های تشخیصی

بیماران براساس یک روش آزمایشگاهی در چهار گروه قرار می گیرند

- مثبت واقعی: شامل افراد بیماری که نتیجه آن آزمایش مثبت شده است.
- منفی واقعی: شامل افراد غیربیماری که نتیجه آن آزمایش منفی شده است.
- مثبت کاذب: شامل افراد غیربیماری که نتیجه آن آزمایش مثبت شده است.
- منفی کاذب: شامل افراد بیماری که نتیجه آن آزمایش منفی شده است.

***دقت precision و عدم دقت imprecision*

منظور از دقت، نزدیکی بین نتایج حاصل از اندازه گیری های تکراری یک انالیت در یک نمونه یا روش می باشد. طبق تعریف CLSI برای بیان دقت یک اندازه گیری، از معیارهای آماری عدم دقت شامل انحراف معیار SD و یا ضریب تغییرات CV استفاده می شود.

** درستی (Trueness) و تورش (Bias)

به نزدیکی میانگین نتایج حاصل از اندازه گیری های تکراری یک انالیت در یک نمونه با مقدار واقعی انالیت، درستی (Trueness) گفته می شود. طبق تعریف CLSI به میزان تفاوت و یا درصد تفاوت بین مقدار واقعی و مقدار متوسط اندازه گیری شده به ترتیب تورش (Bias) مطلق و نسبی گفته می شود.

** صحت (Accuracy)

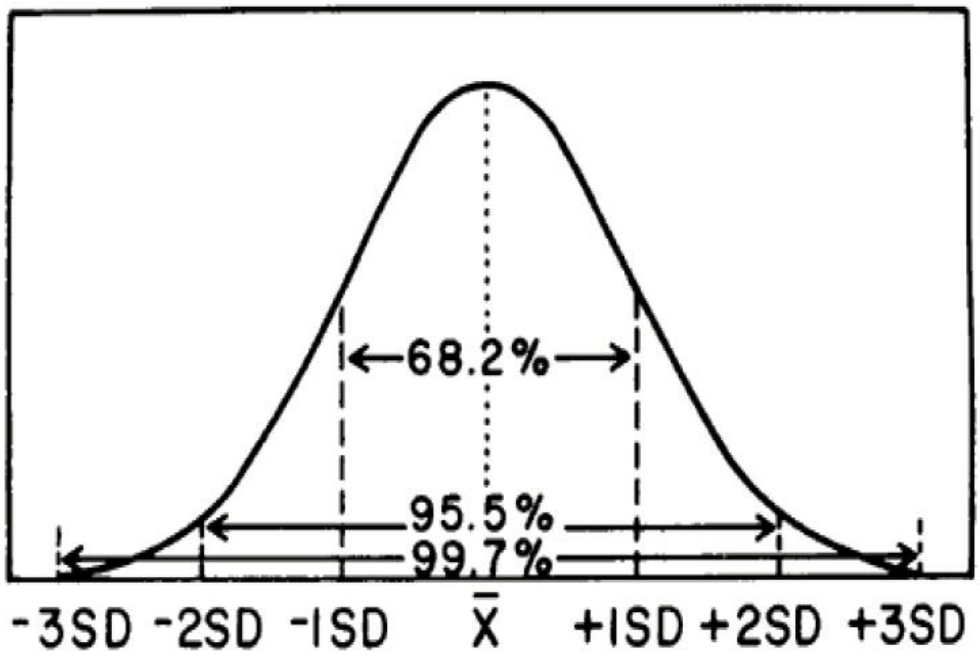
صحت به نزدیکی بین نتیجه به دست آمده از یک روش با یک بار اندازه گیری با نتیجه به دست امده از یک روش مرجع یا مقدار واقعی انالیت گفته می شود.

توزیع نرمال: توزیع گوسین یا طبیعی

نوعی توزیع است که داده ها به طور برابر در بالا و پایین میانگین قرار بگیرند و منحنی رسم شده شبیه یک زنگوله می شود. در یک توزیع نرمال مشخصات زیر وجود دارد و داده های یک توزیع از توزیع نرمال باید تبعیت کنند.

- 68.26 درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean} \pm 1SD$ قرار می گیرد.
- 90 درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean} \pm 1.64SD$ قرار می گیرد.
- 95درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean} \pm 1.96SD$ قرار می گیرد.
- 95.5درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean} \pm 2SD$ قرار می گیرد.
- 99.74درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean} \pm 3SD$ قرار می گیرد.

- 99.98درصد مقادیر در محدوده $\text{Mean}\pm 4SD$ قرار می گیرد.



دامنه مرجع:(Reference Interval)

معمولا دامنه مرجع توسط اندازه گیری مقدار یک انالیت در تعداد قابل توجهی از افراد سالم (حداقل 120 نمونه ولی ترجیحا 200-300 نمونه) تعیین می شود. پس از اندازه گیری انالیت در این جمعیت، میانگین و SD محاسبه می شود. در انالیت هایی که توزیع انها نرمال است، دامنه مرجع محدوده $\text{Mean}\pm 2SD$ را شامل می شود.

** دامنه مرجع ممکن است بین مردان و زنان مشابه یا متفاوت باشد.

**دامنه مرجع بین گروه های سنی مختلف ممکن است متفاوت باشد.

حساسیت(Sensitivity)

حساسیت یک آزمون، عبارت است از توانایی آزمون در شناسایی مثبت های واقعی یا تشخیص صحیح کسانی که واقعا بیمار هستند. مثلا وقتی گفته می شود حساسیت یک آزمون، معادل 90٪ است منظور این است که آزمون مورد اشاره قادر به تشخیص 90٪ موارد بیماری است. به عبارت دیگر در 90٪ موارد، مثبت واقعی و در 10٪ موارد، منفی کاذب را نشان می دهد و قادر به تشخیص 90٪ بیماران واقعی بوده ولی 10٪ مابقی را نمی تواند تشخیص دهد. به عبارتی دیگر حساسیت یک تست، عبارت از نسبت مثبت های واقعی به کل افراد بیمار است.

ویژگی(Specificity)

ویژگی یک آزمون، عبارت است از توانایی آزمون در شناسایی منفی های واقعی یا تشخیص صحیح کسانی که واقعا بیمار نیستند. مثلا وقتی گفته می شود ویژگی یک آزمون، معادل 85٪ است منظور این است که آزمون مورد اشاره قادر به تشخیص 85٪ افراد سالم است و به عبارت دیگر چنین آزمونی در 85٪ موارد، منفی واقعی و در 15٪ موارد، مثبت کاذب را نشان می دهد. همچنین می توان گفت، ویژگی یک تست عبارت از نسبت منفی های واقعی به کل افراد سالم است.

آزمون های با ویژگی پایین، تعدادی از افراد سالم را به عنوان بیمار، تلقی می کند و مثبت کاذب فراوانی به بار می آورد.

کالیبراسیون(Calibration)

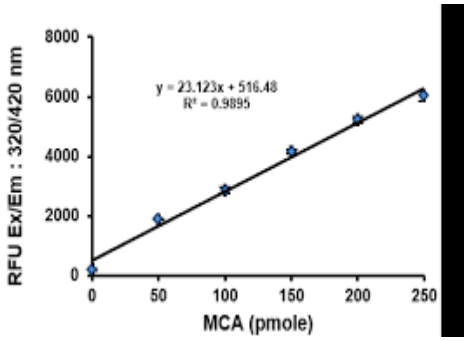
کالیبراسیون عبارت است از یک سری عملکرد که تعیین کننده رابطه بین ارزش های به دست آمده از یک ماده و ارزش مورد انتظار آن می باشد.فرایند کالیبراسیون با استفاده از کالیبراتور و یا مواد مشابه و یا اصلاح ضرایب صورت می گیرد.

کالیبراسیون مقایسه یک دستگاه اندازه گیری با یک کالیبراتور و تعیین خطای دستگاه نسبت به آن و در صورت لزوم تنظیم دستگاه می باشد.

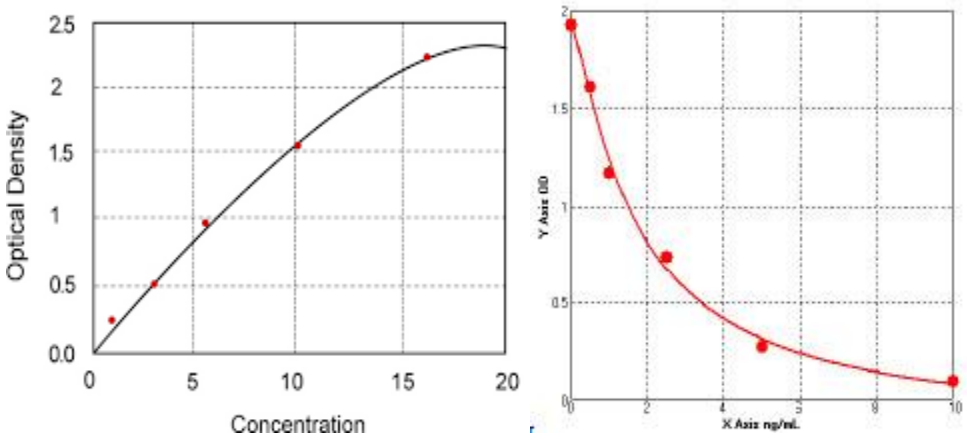
کالیبراسیون معمولا به صورت دو نقطه ای و یا چند نقطه ای است.

در کالیبراسیون دو نقطه ای نمودار خطی (Linearity) است و معمولا یک نقطه، صفر یا نقطه ای نزدیک صفر در محدوده خطی کیت و نقطه دیگر به صورتی انتخاب می شود که بالاترین غلظت محدوده خطی کیت را پوشش دهد.

a)



در کالیبراسیون چند نقطه ای که بیشتر در ایمونواسی از جمله الایزا و شمارش گرهای پرتو گاما استفاده می شود، از حداقل 3 استاندارد استفاده می گردد.بدیهی است که هر چه تعداد نقاط بیشتر باشد صحت اندازه گیری بیشتر می شود.



نوبت کاری (Run کاری)

یک نوبت کاری محدوده یا فاصله زمانی برای گروهی از نمونه ها می باشد که برای نظارت برعملکرد آن نوبت، از یک ضابطه کنترلی واحد استفاده شده است.

** در یک نوبت کاری، متدولوژی، کاربر، ماده کنترل، کالیبراسیون بدون تغییر باقی می ماند.

**یک نوبت کاری، در مراکز کوچک معادل یک روز در نظر گرفته می شود.

**حداکثر زمان قابل قبول برای نوبت کاری در ازمایشگاه بیوشیمی 24 ساعت است.

** در یک نوبت کاری می توان یک یا چند نمونه کنترل راهمزمان یا در فواصل مختلف استفاده کرد.

کنترل کیفیت داخلی بر پایه نمونه کنترل و نتایج بیماران

**کنترل کیفیت داخلی برپایه نتایج بیماران: شامل ارزیابی فردی و ارزیابی گروهی می باشد.

کنترل کیفیت داخلی براساس نتایج یک بیمار منفرد

- نتایج انفرادی فرد: مقایسه نتایج قبلی با نتایج فعلی بیمار
- بررسی ارتباط بالینی: ارتباط بین نتایج آزمایش و وضعیت بالینی بیماران
- Limit Checks: نتایج در محدوده ای که با شرایط فیزیولوژیک منافات دارد باید از نظر احتمال اشتباهات تایپی مانند قرار دادن ممیز در محل اشتباه، بررسی شود. به طور مثال محدوده هشدار پایین و هشدار بالا تست آمیلاز به ترتیب 5 و 1000 می باشد چنانچه نتیجه بین این محدوده نباشد خطایی رخ داده است. (توجه کنید محدوده هشدار با محدوده نرمال متفاوت می باشد. عدد 1 و عدد 2000 برای امیلاز وجود ندارد.)

- دلتا چک با نتایج قبلی: اساس این روش بر این موضوع استوار است که مقادیر آنالیت ها در بدن یک فرد در مدت زمان مشخص، در محدوده مشخصی تغییر می کند. Ladenson دلتا چک را در مدت زمانی 3 روزه برای تعدادی از آنالیت ها بررسی نموده که به صورت یک جدول می باشد. قسمتی از این جدول آورده شده است.

Test	Delta Check Limit
Albumin	20%
Calcium total	15%
Phosphorus	20%
sodium	5%
Thyroxin	25%
potassium	20%
creatinine	50%

منظور این است به طور مثال برای تست Albumin در فاصله زمانی 3 روز، دو بار از بیمار نمونه گیری انجام شود، نتایج تست تا 20٪ تفاوت، قابل قبول است. چنانچه بیشتر از 20٪ باشد خطا صورت گرفته است.

- بررسی ارتباط با سایر آزمایش های فرد به طور مثال رابطه بین TIBC و ترانسفرین یا رابطه بین TSHو T_4
- آزمون دوتایی در یک آزمایشگاه/آزمایش بازبینی یا چک تست

(Duplicate Test and Check Test)

آزمون دو تایی / بازبینی یک آزمون آماری جهت بررسی عدم دقت دستگاه می باشد. در این روش تعدادی از مراجعین به آزمایشگاه را انتخاب کرده و هر کدام را دو بار به دستگاه داده و پس از محاسبه میانگین، SD و CV اختلاف داده ها در دو سری محاسبه کرده به این ترتیب اگر اختلاف بیشتر از $2SD$ باشد وجود خطای تصادفی مشخص می شود.

کنترل کیفیت داخلی بر پایه نمونه کنترل

1- طراحی فرایند کنترل کیفیت: ابتدا دستورالعمل یا روش اجرایی استاندارد(SOP) کنترل کیفیت داخلی تهیه می شود.

2-انتخاب نمونه کنترلی

در انتخاب نمونه کنترل موارد زیر باید توجه شود

- پایداری: کنترل باید مدت طولانی پایداری داشته باشد. مواد نگهدارنده مداخله گر نداشته باشد.(بهتر است برای یک سال نمونه کنترل تهیه شود)
- مشابهت با نمونه انسانی
- هموژن بودن و یکنواختی
- عدم وجود اثرات زمینه ای(Matrix effect)
- بسته بندی مناسب: نشتی نداشته باشد. به حجم رسانی و نگهداری ساده باشد.
- قیمت ارزان و تعداد زیاد مصرف کنندگان
- عاری از عوامل میکروب زا(باکتری، ویروس و قارچ و ...)

انواع کنترل:دو نوع کنترل های لیوفیلیزه و کنترل های مایع موجود می باشد. در زمان انتخاب باید به مزایا و معایب هر یک توجه کرد. به عنوان مثال خطا در به حجم رسانی کنترل های لیوفیلیزه ممکن است موجب بروز مشکلاتی شود در حالی که کنترل های مایع آماده مصرف می باشند. در عین حال مواد موجود در کنترل های مایع ممکن است در برخی روش ها تداخل نموده و باعث خطا شود.

***دستورالعمل تضمین کیفیت و نظارت بر متغیر ها و عوامل موثر بر فرآیند انجام آزمایش*

جهت کنترل عوامل و متغیرهای متعدد آنالیتیکی و مرتبط با فرآیند آزمایش موارد زیر در نظر گرفته می شود

1-انتخاب، ارزیابی و استقرار روش های مورد استفاده استاندارد کیفیت

2-تجهیزات مناسب تخصصی، رعایت شرایط استقرار، نگهداری و کنترل کیفی و پایش مداوم و کالیبراسیون به موقع تجهیزات

3-استفاده از محلول ها، واکنشگرها، مواد مصرفی، کیت های مناسب

4-ثبات و تامین برق با نوسانات قابل قبول براساس راهنمای تجهیزات مورد استفاده

5- تامین الزامات تجهیزات گرمایشی و سرمایشی از جمله یخچال ها، فریزها،اتوکلاو، بن ماری ، فور و تجهیزات مشابه

6-تامین فضای مناسب

7-رعایت الزامات مربوط به راه اندازی، نگهداری وکنترل کیفی تجهیزات

8-سرویس به موقع تجهیزات

9- پرکردن فرم های (Log book) برای تجهیزات : این فرم ها در هرشیفت کاربا ذکرنام فرد مستقر در هر بخش، وضعیت دستگاه را مکتوب نشان می دهد.

دستورالعمل نحوه انجام آزمایشهایی که درآزمایشگاه بیوشیمی انجام میشود.

هدف : یکپارچه سازی دستورالعمل ها و روش های انجام آزمایش ها، کاهش خطاهای فردی می باشد.

روش انجام:

1-شروع کار با روشن کردن دستگاه وکنترل ظروف reagent و موجودی آب مقطر و همچنین روشن کردن و کنترل بن ماری

2- دادن نمونه کنترل در دوسطح نرمال و بالا

3-بررسی نتایج کنترل کیفی و انجام موارد نیازمند اصلاح

4-نمونه های بیماران بعد از بررسی در بخش پذیرش در صورت تایید و تعیین الویت های عادی و اورژانسی نمونه ها به بخش بیوشیمی ارسال می شوند.

5-سانتریفوژکردن نمونه های لخته شده

تفکیک نمونه های اورژانسی و الویت دادن به انها

تعیین معایب نمونه ها (کم بودن، همولیز بودن،...)و اعلام رد نمونه به بخش مربوطه

6-انتقال سرم بیماران به کاپ مخصوص دستگاه

7- برنامه دادن به دستگاه و تعریف تست های بیماران

8- انجام تست توسط دستگاه (تنظیمات تست ها براساس SOP تدوین شده در آزمایشگاه می باشد.)

9- بررسی نتایج بیماران واعلام فوری مقادیر بحرانی (Critical value) به بخش،

مقادیر بحرانی Critical value: مقادیری که برای بیمار خطر جانی و مرگ دارد وطبق محدوده تعریف شده در دستورالعمل می باشد.

دستورالعمل استاندارد کنترل کیفیت آزمایشات بیوشیمی

هدف:

- اطمینان از کیفیت نتایج آزمایشات
- کاهش خطاهای تشخیصی

- اثربخشی اقدامات تشخیصی

اقدامات

1-کنترل ورودیها: منظور مواد اولیه، نمونه های بیماران، کیت ها،کالیبراتور ها، لوله های آزمایش، سرسمپلرها، انواع موادمصرفی، دستگاه ها، تجهیزات،...

2-کنترل حین فرایند شامل کنترل کیفی داخلی و کنترل کیفی خارجی

3-کنترل خروجی ها: کنترل جوابهایی که وارد سیستم میگردد.

کنترل کیفی داخلی : معمولا بایستی از نمونه های کنترلی تهیه شده توسط شرکت ها استفاده کرد که داری سه سطح نرمال و high و low موجود می باشد. استفاده حداقل دو سطح جهت کنترل تست های بیوشیمی الزامی می باشد. انتخاب مواد کنترلی جهت بررسی صحت و دقت می باشد و به موارد پایداری ، یکنواختی، بسته بندی مناسب نمونه کنترلی توجه شود.

طرز تهیه سرم کنترل لیوفیلیزه:

دقیقا مشابه آنچه در برشور آمده است انجام میگیرد و بعد از تهیه در کاپ ها تقسیم شده و در فریزر 20-درجه نگهداری می شوند و در شروع هرrun کاری یکی از کاپ ها حاوی سرم کنترل به مدت 15-20 دقیقه در دمای محیط نگهداری می شود تا ذوب شود سپس چند بار سر و ته کرده و کلیه تست هایی که در ان روز قرار است انجام شود، یرای سرم کنترل انجام شود.

در صورت استفاده از سرم کنترل با lot number جدید یا تعویض نمونه کنترلی یا معرف های جدید با متد جدید باید توجه شود که نمونه کنترل جدید 20 بار توسط دستگاه در مورد هر تست مورد خوانش قرار گیرد.

بعد از حذف اعداد پرت (طبق دستورالعمل زیر) میانگین و انحراف معیار(SD) و ضریب انحراف(CV) محاسبه شود.

با توجه به اینکه برنامه های نرم افزاری روی دستگاه های اتوانالایزر بیوشیمی نصب شده است، بعد از حذف اعداد پرت و محاسبه SD-CV-Mean منحنی لوی جنینگ برای هر تست رسم میگردد. پرسنل فنی آزمایشگاه بعد از بررسی جوابهای کنترل در صورت قابل قبول بودن جواب کنترل ها، نمونه های بیماران را به دستگاه می دهند.

نحوه حذف اعداد پرت به دو روش می باشد:

1-در صورت خوانش 20 بار سرم کنترل یرای یک پارامتر یا تست از اعداد بدست اماده میانگین و انحراف معیار گرفته می شود و سس انحراف معیار را در عدد3/14 ضرب کرده تا محدوده جدید تعریف شود، حال اعداد خارج از این محدوده راحذف کرده و میانگین و انحراف معیار جدید را بدست اورده و بایستی ان را برای ادامه کنترل کیفی منظور کرد.

2-محاسبه میانگین و انحراف معیار حداقل 20آزمایش روی پارامتر وسپس طبق فرمول زیر اعداد پرت را حذف می نماییم

$$\frac{\text{میانگین}-\text{عدد مشکوک}}{SD}$$

نتیجه این کسر باید کمتر از 2/75 باشد. در صورت بالاتر بودن رقم مشکوک باید حذف شده و در محاسبه میانگین بکار نرود.

- نکته: در صورتی که نتایج سرم کنترل خارج از حد مورد نظر بود نباید بلافاصله از نمونه کنترل جدید استفاده کرد، بلکه باید کلیه فرایند های آزمایش از جمله آب مقطر، معرف ها،... بررسی و در صورت عدم اصلاح، تست را روی نمونه کنترلی جدید انجام داد.
- دامنه قابل قبول سرم کنترل در هر آزمایشگاه برای خود آن آزمایشگاه تعریف می شود.
- هدف اصلی برنامه کنترل کیفی، داشتن سیستمی است که بتواند بیشتر از ٪90 کلیه خطاها را پیدا کند.
- تمام مراحل کنترل کیفی و اقدامات انجام شده باید بصورت مکتوب در آزمایشگاه موجود باشد
- در صورت عوض شدن Lot Number معرف برای اطمینان از روند کنترل کیفی ،نمونه های پنج بیمار که با lot number قبلی گذاشته شده اند با معرف جدید تکرار می شوند،با نتایج مقایسه ای اختلاف جواب قبل و بعد از تعویض معرف جدید باید در محدوده قابل پذیرش باشد.

تفسیر نتایج

برای تفسیرنتایج هر آزمایشگاه می تواند براساس شرایط و سطح کیفیت مورد نیاز خود هر یک از روش های تفسیر Levy jenning، Westgard یا WHO را انتخاب کند.

چارت کنترلی Levy- jenning

برای رسم و استفاده از چارت لوی-جنینگ مراحل زیر را دنبال کنید.

۱ -نمونه خون کنترل حداقل به تعداد ۲۰ بار در روزهای مختلف مورد خوانش قرار می دهیم و میانگین و انحراف معیار خوانش ها را محاسبه می کنیم

۲ -به طور دستی یا نرم افزار یک چارت کنترل کیفی رسم کرده به طوری که محورy ها مقادیر نمونه کنترلی بوده و محدوده $Mean \pm 4SD$ را در برگیرد.

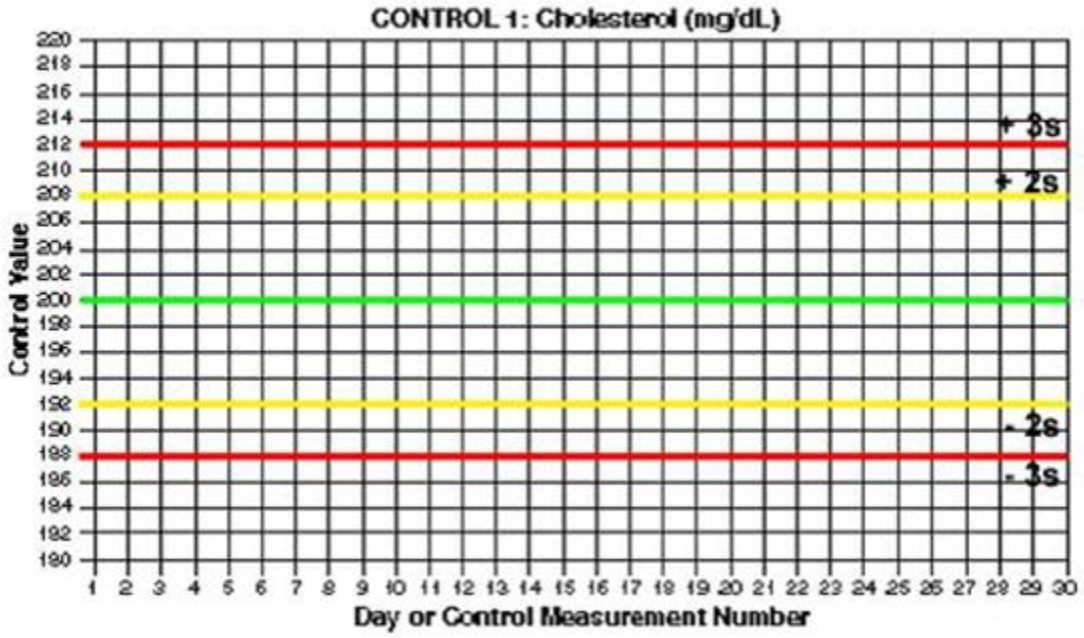
۳ -توجه کنید که اگر تعداد کنترل هایی که در یک سری کاری استفاده می شود ۲ یا بیشتر باشد (به طور مثال مواد کنترلی در دو سطح normal و high)محدوده $Mean \pm 3SD$ را به عنوان محدوده قابل قبول انتخاب نمایید اما اگر در سری کاری فقط یک نمونه کنترل آزمایش می شود محدوده $Mean \pm 2SD$ را ملاک قرار دهید.

۴ -میانگین و محدوده مورد قبول خود را به صورت خطوط افقی ترسیم نموده و خطوط عمودی را زمان انجام آزمایش در نظر بگیرید. در هرسری کاری ابتدا خون کنترل را آزمایش نموده و نتایج خوانش را روی چارت علامتگذاری نمایید. تا زمانی که نتایج مورد انتظار در محدوده $Mean \pm 3SD$ یا $Mean \pm 2SD$ (باتوجه به محدوده انتخاب شده) قرار داشته باشند، نتایج تحت کنترل بوده و اگر نتایج از این محدوده خارج شد نتایج خارج از کنترل در نظر گرفته می شود و اقدام اصلاحی بر اساس نوع خطای مشاهده شده می بایستی صورت پذیرد.

در اکثر آزمایشگاه ها از این چارت استفاده می شود. استفاده از هر یک از محدوده های $Mean \pm 3SD$ و $Mean \pm 2SD$ دارای معایبی می باشد.

اگر محدوده $Mean \pm 3SD$ انتخاب شود احتمال شناسایی خطا کاهش می یابد اما میزان رد کاذب false rejection کمتر از ٪5 می باشد.

اگر محدوده $Mean \pm 2SD$ انتخاب شود احتمال شناسایی خطا افزایش می یابد اما میزان رد کاذب false rejectionافزایش می باشد.



چارت Levey-Jenning پارامتر کلسترول با میانگین ۲۰۰ و انحراف معیار ۴

تفسیر چارت کنترلی با قوانین چند گانه وستگارد

در روش معروف QC Westgard multirule شش قانون برای قضاوت در مورد قابل قبول بودن نتایج آزمایشگاهی به کارگرفته می شود.

1_{2S} : یک کنترل خارج از محدوده mean±2SD به معنی هشدار بوده و لازم است سایر قوانین بررسی گردند.

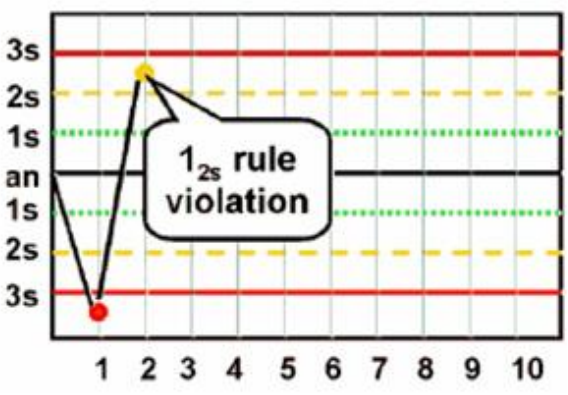
1_{3S} : یک کنترل خارج از محدودهmean±3SD باعث رد نتایج شده و می تواند نشان دهنده خطای راندوم یا شروع خطای سیستماتیک باشد.

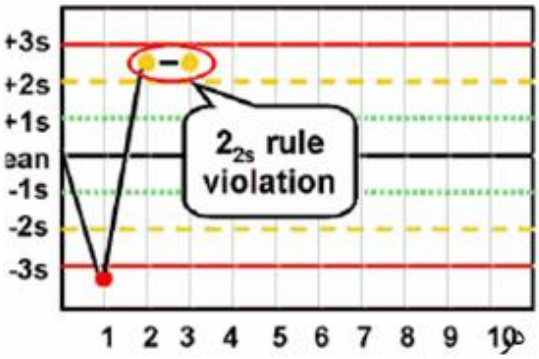
2_{2S} : دو خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده محدودهmean±2SD باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

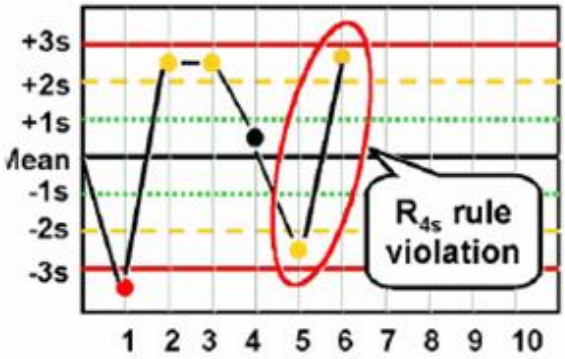
R_{4S}: یک خوانده خارج از محدودهmean+2SD و دیگری خارج از محدوده mean-2SDباعث رد نتایج شده و نشان دهنده خطای راندوم می باشد.

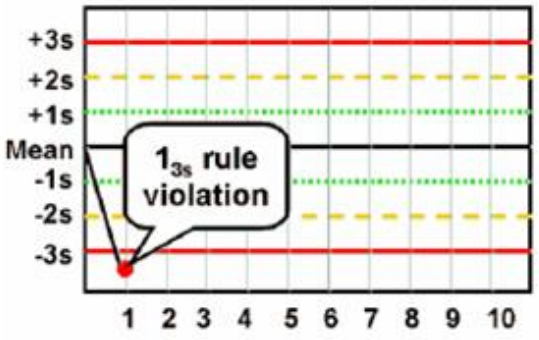
4_{1S} : چهار خوانده متوالی همسو و خارج از محدوده 1SD+ یا 1SD- باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

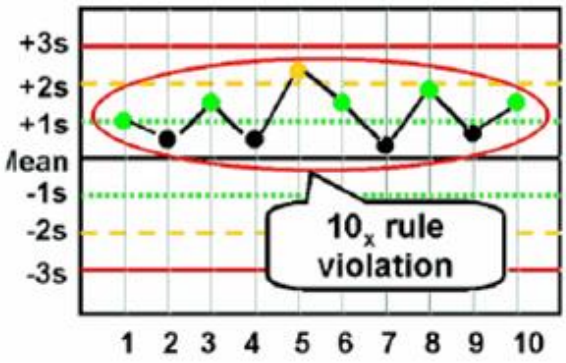
10_X : ده خوانده متوالی در یک طرف میانگین (بالا یا پایین میانگین و بدون توجه به اندازه انحراف) باعث رد نتایج شده و به خطای سیستماتیک حساس می باشد.

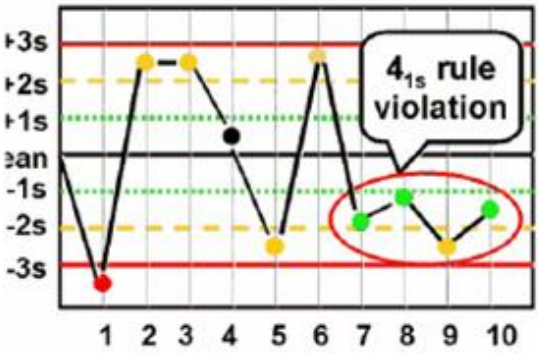

3s
2s
1s
an
1s
2s
3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1_{2s} rule violation


+3s
+2s
+1s
ean
-1s
-2s
-3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2_{2s} rule violation


+3s
+2s
+1s
Mean
-1s
-2s
-3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
R_{4s} rule violation


+3s
+2s
+1s
Mean
-1s
-2s
-3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1_{3s} rule violation


+3s
+2s
+1s
Mean
-1s
-2s
-3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
10_x rule violation


+3s
+2s
+1s
ean
-1s
-2s
-3s
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
4_{1s} rule violation

قوانین WHO

در کتب مختلف که با موضوع تضمین کیفیت در ازمایشگاه توسط WHO چاپ گردیده است، به روش های گوناگون تفسیر چارت های کنترلی برخورد می کنید. یکی از نمونه ها در این جا ذکر شده است.

تفسیر نمودار کنترل توسط سازمان بهداشت جهانی بر اساس رفرانس WHO/LAB/1998	
خطا	**تفسیر**
نتیجه یک خوانش از خون کنترل خارج از ± 2SD	هشدار
نتیجه یک خوانش از خون کنترل خارج از± 3SD	رد نتایج بیماران (خطای سیستماتیک یا راندوم)
دو نتیجه متوالی و همسو خارج از ± 2SD	رد نتایج بیماران(خطای سیستماتیک)
چهار نتیجه متوالی و همسو خارج از ±1SD	رد نتایج بیماران(خطای سیستماتیک)
شش نتیجه نمونه کنترل در یک طرف میانگین	هشدار (احتمال خطای سیستماتیک)

الگو های غیرطبیعی و نامنطبق مشاهده شده در نمودارهای کنترل

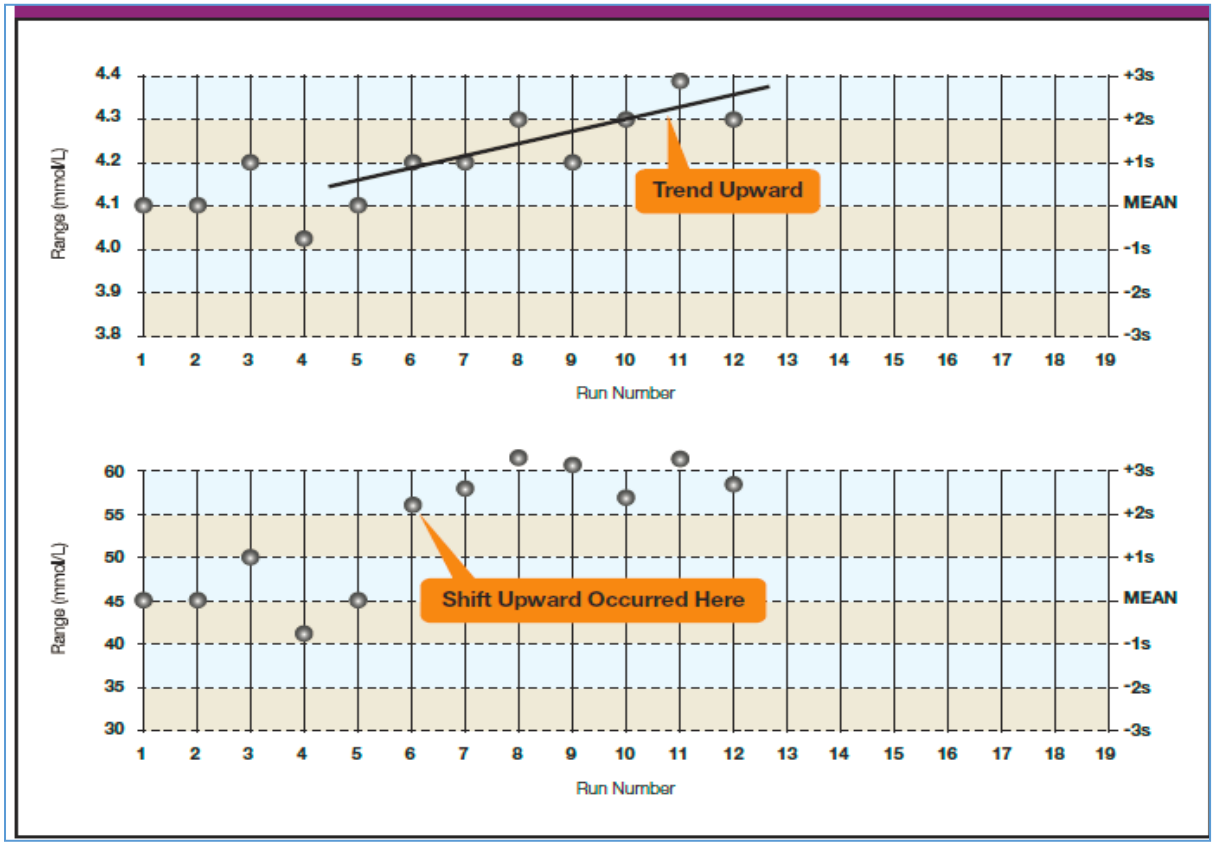
Shift: تغییرات ناگهانی و یکباره در میانگین کنترل به صورت شیفت به سمت محدوده بالا با پایین میانگین (حداقل 6 داده)تعریف می شود

1. تغییر در تهیه و فرمولاسیون کنترلها و ریجنت ها
2. تغییر در Lot number کنترلها و ریجنت ها
3. تغییر ناگهانی در انکوباسیون در مورد آزمایش های آنزیمی
4. تغییر در دما و رطوبت اتاق
5. نقص در سمپلینگ سیستم
6. نقص در سیستم توزیع کنترلها و ریجنت ها
7. کالیبراسیون نادرست

- Trend: الگوی گرایشی جهت دار(صعودی یا نزولی) می تواند ناشی از تغییرات تدریجی و مداوم فیزیکی و محیطی و... باشد.

1. خرابی منبع نور دستگاه

2. انباشته شدن تدریجی ظرف نمونه یا محلول از گرد و غبار
3. انباشته شدن تدریجی سطح الکترودها از گرد و غبار
4. خراب شدن تدریجی مواد کنترلی
5. کهنه شدن و خرابی ریجنت ها
6. خراب شدن تدریجی محفظه انکوباسیون در مورد تست های آنزیمی
7. خراب شدن تدریجی فیلتر نوری دستگاه
8. خراب شدن تدریجی کالیبراسیون



انواع خطا های آزمایش

خطاهای اتفاقی یا تصادفی(Random Errors)

نوعی از خطا که در مجموعه ای از نتایج آزمایش ها به طور غیر قابل پیش بینی و غیرقابل تخمین با علت نامشخص رخ می دهد، مثلا وجود حباب هوا در مسیر برداشت نمونه یا معرف توسط دستگاه، نوسان های تجهیزات و... این خطاها نوسان پاسخ ها را افزایش می دهند، در مسیر ثابتی نبوده و نتایج را به هر دو جهت کاهش و افزایش تغییر میدهد.خطاهای اتفاقی روی انحراف معیار اثر میگذارند ولی تغییر زیادی روی میانگین ندارند.

منابع خطاهای تصادفی

- وجود حباب در ظرف حاوی واکنشگر
- وجود حباب در پی پتور نمونه یا معرف
- مخلوط نشدن عناصر تشکیل دهنده واکنشگر
- دمای ناپایدار
- شرایط ناپایدار انکوباسیون
- نوسانات جریان برق
- نوسانات منبع نوری
- نوسانات کاری کاری کاربر به هنگام برداشتن حجم یا عدم رعایت زمان ها

خطاهای سیستماتیک یا نظام مند(Systematic Error)

خطای نظام مند نوعی از خطا است که باعث تغییر در نتایج آزمایش می شوند.بدین معنی که به طور ثابت و در یک جهت نمودار بالاتر یا پایین تر از مقادیر واقعی است.این خطا قابل پیش بینی بوده و پس از شناسایی قابل اصلاح است و به علت عملکرد اشتباه سیستم می باشد.

منابع خطای سیستماتیک

- تغییر درشماره سری ساخت معرف
- تغییر در شماره سری ساخت کالیبراتور
- مقادیر نادرست کالیبراتور
- ناپایدارشدن معرف ها در مجاورت نور
- نکهداری نامناسب دستگاه ها
- تغییر غلظت آنالیت ها در کالیبراتور
- آماده سازی نامناسب معرف ها
- استهلاک قطعات الکتریکی، مکانیکی و اپتیک دستگاه
- استفاده از استاندارد های غیر دقیق ئ نامناسب
- کالیبراسیون ضعیف یا نادرست سیستم

خطای کل مجاز (TAE یا Total Allowable Error)

خطای کل مجاز ، مجموع خطای سیستماتیک و تصادفی قابل قبول در یک روش آزمایش است .

کنترل کیفی خارجی

در این برنامه از آزمایشگاه مرکزی یک نمونه جهت آنالیز و آزکایش به آزکایشگاه های مختلف به منظور بررسی کیفیت عملکرد آزمایشگاه ارسال می شود. آزمایشگاه ها پس از انالیز، نتایج بدست آمده را به آزمایشگاه مرکزی ارسال می کنند.یک روش تععین عملکرد آزمایشگاه ها محاسبه شاخص انحراف معیار (SDI) می باشد.

$$\text{SDI} = \frac{Laboratory\ Result - Group\ mean}{Group\ SD}$$

موفق باشید

گردآورندگان : فریبا محمدی ، لیلا پورمعصومی، مریم فولادپور، پیوند ناظری ، محمد حسین آشوب