

بسم الرحمن الرحیم

مقدمه‌ای بر
فعالیت‌های عملی
آزمایشگاه‌های بالینی و مولکولی

مؤلف:

سید علی سامانی

دانش‌آرشد ژنتیک

با همکاری:

رضا سامانی

استادان مشاور

دکتر کامران قاندي (دانشیار دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان)

مهندس منصوره آزاده (بنیانگذار موسسه زیست‌فناوری تهران)

فهرست مطالب

۱۱.....	انماط بیمار پزشک و بیمار
۱۲.....	نمونه گیری
۱۳.....	نمونه گیری
۱۳.....	انتقال نمونه
۱۴.....	نمونه ها و مشاهدات اولیه
۱۴.....	نمونه ها باید درست داده شوند
۱۵.....	وسایل و ابزارهای مورد نیاز
۱۵.....	سپرلر
۱۶.....	بتری دیش
۱۶.....	پیپت
۱۷.....	لام و لامل
۱۸.....	اتوکلادو
۱۸.....	فور (oven)
۱۹.....	بن ماری
۲۰.....	سانتریفوژ
۲۱.....	انکوباتور
۲۱.....	هود لامینار
۲۲.....	اسپکتوفتومتر
۲۳.....	میکروسکوپ
۲۳.....	انواع میکروسکوپ
۲۴.....	خون (blood)
۲۵.....	نحوه گرفتن خون
۲۶.....	هماتوکریت
۲۷.....	CBC
۲۷.....	RBC
۲۸.....	WBC

۲۹..... تست potassium

۳۰..... تست Ca^{2+}

۳۲..... تست بارداری

۳۳..... تست قند خون

۳۴..... اندازه‌گیری قند خون

۳۴..... تست بررسی مقدار هموگلوبین متصل به قند A1C

۳۵..... تست چربی خون

۳۶..... تست اوره

۳۷..... تست HIV

۳۷..... تست‌های تشخیص HIV

۳۹..... تست ادرار

۴۳..... کربن دی‌اکسید

۴۵..... تست مدفوع

۴۶..... محیط سالمو-لا-ش گلا

۴۶..... محیط سلنیت

۴۷..... تست‌های مولکولی

۵۲..... محاسبه درصد GC

۵۲..... آنزیم پلی‌مراز

۵۳..... پلی‌مراز تگ

۵۴..... بافر PCR

۵۴..... غلظت میزیم

۵۵..... منابع بالقوه آلودگی PCR

۵۷..... مراحل PCR

۶۰..... تکثیر صحیح محصول PCR

۶۳..... مشکلات PCR

۶۵..... انواع PCR

۶۸..... مرحله تبدیل mRNA به cDNA

..... Real time PCR

..... اصول کار Real time PCR

۷۸..... تست سایتومگالوویروس CMV

۷۸..... تشخیص

۷۸..... یافت‌شناسی

۷۹..... کشت

۷۹..... سرولوژی

۷۹..... تست هرپس سیمپلکس ویروس HSV

۸۱..... تست توکوپلازما TOXO Plasma

۸۳..... تست غذا

- ۸۴..... کاربرد روش RT-PCR در تست های تشخیصی
- ۸۴..... تست روبلا Rubella
- ۸۵..... Progressive multifocal leukoencephalopathy تست
- ۸۷..... واکسن نامه
- ۹۰..... مراجع

مقدمه

امروزه به دلیل تغذیه نامناسب، عدم تحرک، آلودگی هوا و آری عوامل دیگر، افراد بخصوص ساکنین شهرهای بزرگ و صنایع دچار بیماری‌های زیادی می‌شوند که می‌توان با انجام تست‌های به موقع و منظم از وقوع آنها پیشگیری و یا آنها را درمان کرد.

درمان‌های صورت گرفته تاکنون در مورد اغلب بیماری‌ها گرچه با شکس‌هایی همراه بوده است، اما شاهد پیشرفت‌های مهمی بوده‌ایم. لازمه بهبود بیشتر در درمان بیماری‌ها انجام تحقیقات بر پایه علم جدید و انجام تست‌های پیشرفته است که این تست‌ها از زمان نمونه‌گیری از بیماران تا اعلام نتایج، نیاز به دقت و فناوری جدید دارد. فناوری جدید در عصر حاضر انجام تست‌های مولکولی دقیق است که جواب‌هایی با اطمینان بیشتری را اختیار محققین و بیماران می‌گذارد.

هدف از نگارش این کتاب بررسی مطالب فوق و آگاهی کامل افراد از نمونه‌گیری تا انجام پیشرفته‌ترین تست‌های مولکولی است.

ارتباط بین پزشک و بیمار

هنگامی که پزشک یک نمونه را به آزمایشگاه ارسال می‌کند تعیین یک یا چند پارامتر را طلب می‌کند، آزمایشگاه باید از طریق

روش‌های متداول خود پارامترهای موردنظر را اندازه‌گیری کند و پاسخ آن را گزارش نماید.

معمولاً نتایج آزمایشگاهی بالاتر از حد طبیعی، طبیعی و پایین‌تر از حد طبیعی هستند و پزشک از این نتایج به نحو مطلوبی استفاده خواهد نمود.

اصول کلی که در مورد تمام نمونه‌های بالینی صادق است و باید مورد توجه قرار بگیرد:

نمونه از لحاظ مقدار بایستی کافی بوده تا بتوان کلیه آزمایش‌ها را روی آن انجام داد.

- نمونه باید تصدیقیت (Representative) داشته باشد، یعنی اگر خلط مرده آزمایش است به جای آن آب دهان گرفته نشود.

- باید نمونه‌ای که گرفته می‌شود آلوده نگردد و در تهیه نمونه از وسایل استریل استفاده شود.

نمونه‌گیری

در آمار نمونه‌گیری انواع متفاوتی دارد که شامل نمونه‌گیری تصادفی، خوشه‌ای، سیستماتیک و... است که نمونه‌گیری از بیماران به طور تقریبی جز دسته‌ی نمونه‌گیری تصادفی قرار می‌گیرد؛ در نمونه‌گیری باید به عوامل زیر توجه داشت:

(۱) شرایط نمونه‌گیری (شرایط نمونه‌گیری، انتقال نمونه،

دریافت نمونه و مشاهدات اولیه و...)

(۲) وسایل و لوازم آزمایشگاهی موردنیاز

(۳) انواع نمونه‌ها و تست‌ها

شرایط نمونه‌گیری

رعایت شرایط نمونه‌گیری یکی از مهم‌ترین و ابتدایی‌ترین مراحل تست‌های تشخیص طبی و مولکولی است، نکته‌ی اولیه این است که در بسیاری از آزمایش‌ها بیمار باید قبل از نمونه دادن ناشتا باشد که از نظر علمی به حالتی گفته می‌شود که فرد حداقل به مدت ۱۲ ساعت از خوردن و آشامیدن خودداری کرده است، اما باید به این نکته توجه داشت که بیمار در صورت احساس تشنگی شدید می‌تواند مقداری آب مصرف کند. (در مورد قطع مصرف دارو در زمان تست با پزشک باید با دکتر مشورت شود).

در شرایطی که بیمار به‌دلیل دارای تحصیلات دانشگاهی در این حوزه باشد، که در صورت ایجاد مشکل با انجام عملکرد مناسب در بهبود وضعیت عمومی بیمار مفید واقع شود.

انتقال نمونه

نکات اولیه در انتقال نمونه‌ها به تشخیصی چه در داخل بیمارستان یا کلینیک و یا ارسال نمونه به وسیله پست به آزمایشگاه رفرنس عبارت‌اند از: نگاه داشتن نمونه در همان حالت اولیه با حداقل تغییر به منظور کاهش خطرات ناشی از آلودگی به تشخیص انتقال‌دهنده نمونه، بایستی آن را در ظرفی با درپوش محکم و مناسب قرار داده و سپس در بسته‌بندی مناسب ارسال گردد.

از قرار دادن نمونه در شرایط نامناسب مانند سرما و گرما، بیش از حد و خشکی بایستی اجتناب ورزید. به منظور جلوگیری از شکسته شدن ظرف در طی انتقال از ظروف شیشه‌ای نباید استفاده گردد. اکثر نمونه‌های مایع خصوصاً نمونه ادرار هرچه سریع‌تر باید به آزمایشگاه انتقال داده شوند.

در بیمارستان‌ها زمان بین گرفتن ادرار و تحویل آن به آزمایشگاه باید حداکثر دو ساعت باشد. چنانچه انتقال سریع نمونه ادرار امکان‌پذیر نباشد می‌توان از مقدار کم بوریگ اسید در ظروف انتقال دهنده ادرار استفاده نمود. در مورد سایر نمونه‌ها می‌توان از یک محیط نگه‌دارنده یا انتقال دهنده طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده نمود.

د. یافتن نمونه و مشاهدات اولیه

در اکثر مایه‌گاه‌های تشخیص طبی محل مخصوصی جهت دریافت نمونه تهیه شده است. به علت احتمال آلودگی کارکنان آزمایشگاه باید از مایه‌گاه برای هر فرد انجام گیرد، در ضمن پوشیدن روپوش مخصوص، دستکش و در بعضی موارد ماسک ضروری است.

آماده‌سازی نمونه شامل مراحل زیر است:

- ثبت اطلاعات در دفتر یا شبکه کامپیوتری آزمایشگاه
- مشاهده و بررسی نمونه از لحاظ ریختی ظاهری لازم جهت پذیرش
- بررسی میکروسکوپی نمونه به منظور تشخیص احتمالی

نمونه‌های که باید عودت داده شوند

۱. نمونه‌هایی که با فرمالین در تماس بوده‌اند (تنها نمونه‌هایی که کمتر از یک ساعت در فرمالین بوده‌اند و بافت‌های بزرگ استنا هستند).

۲. نمونه خلط ۲۴ ساعته مناسب نیست.

۳. نمونه‌هایی که در داخل ظرف نامناسب غیر استریل و آلوده که قسمتی از آن هم نشت کرده باشد و واجد برجسب هشداردهنده باشد باید با مراقبت‌های ویژه انتقال داده شود.

وسایل و لوازم آزمایشگاهی مورد نیاز

لوله آزمایش یا لوله کشت یا لوله نمونه:

یکی از ابزارهای متداول آزمایشگاهی است که در بیشتر آزمایشگاه‌های شیمی یافت می‌شود. این وسیله که از شیشه یا پلاستیک شفاف ساخته می‌شود به شکل یک لوله بلند است که از یک بازو از سر دیگر بسته و به صورت محدب است. لوله آزمایش برای نگهداری، ترکیب کردن و گرم کردن مواد شیمیایی مایع یا جامد در حجم کم استفاده می‌شود. از لوله کشت در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی برای کشت و نگهداری ارگان‌های زنده مانند باکتری‌ها، کپک‌ها و ... استفاده می‌شود و در پزشکی برای نگهداری از نمونه‌های خون استفاده می‌شود. در آزمایشگاه‌های مختلف برای سازمان‌دهی لوله‌های آزمایش، از رک یا جا لوله‌ای استفاده می‌شود.

سمپلر

میکرو پیپت‌ها برای حجم‌های کم مایعات و لوله‌های ۱ تا ۱۰۰۰ میکرو لیتر ساخته شده‌اند. پیپت‌های پلاستیکی یکبار مصرف که دارای علامتی برای حجم خاصی هستند نیز وجود دارند. این پیپت‌ها با خاصیت موینگی پرگشته و خالی شدن آنها به کمک یک قطره‌چکان پلاستیکی صورت می‌گیرد. رایج‌ترین نوع میکرو پیپت‌ها نوع نیمه‌خودکار آنها است که از

خاصیت جابجایی هوا برای پیت کردن استفاده می‌کنند. از این نوع میکرو پیت‌ها تحت عنوان سمپلرها دارای یک سر سمپلر tip پلاستیکی یک بار مصرف هستند.

سمپلر Eppendorf:

این نوع سمپلر دارای دو دکمه است:

- دکمه شماره ۱ برای کشیدن و خارج سازی نمونه بکار می‌رود. با فشار بر روی این دکمه تا اولین مرحله می‌توانید حجم مورد نیاز خود را کشیده و یا آن را خارج سازید با فشار دادن این دکمه مرحله دوم قادر خواهید بود تا باقیمانده حجم را از نوک سر سمپلر خارج نمایید.
- دکمه شماره ۲ رای دو انداختن سر سمپلر بکار می‌رود (OUT)

پتری دیش:

ظروفی بشقابی شکل و مدور هستند که دارای سرپوش مخصوص هستند و جهت تهیه محیط کشت جانداران، کشت سلول یا خزه‌های ریز استفاده می‌شوند. جنس آن معمولاً پلاستیک یا پلاستیک است.

پیت:

پیت‌ها معمولاً در دو نوع پیت مدرج و پیت حباب‌دار (پیت ژوژه) ساخته می‌شوند. پیت مدرج یک لوله شیشه‌ای صاف است که یک انتهای آن نازک‌تر است. در این نوع پیت بدنه وسیله بر حسب حجم‌های مختلف مدرج شده است و دقت وسیله به کوچک‌ترین واحد تقسیم‌بندی روی بدنه بستگی دارد. در این نوع

پیست می توان حجم های مختلف و دلخواه را بر اساس ظرفیت پیست برداشت.

پیست حباب دار از یک لوله صاف که در میانه آن یک حباب وجود دارد تشکیل شده است و در قسمت بالایی آن یک خط نشانه وجود دارد. در این نوع پیست برخلاف پیست مدرج فقط مقدار حجم تعیین شده روی ابزار قابل برداشتن است. برای پر کردن پیست ها از ابزار دیگری به نام پوآر (پیست پرکن) استفاده می کنند. این ابزار که در انتهای لوله پیست بسته می شود با ایجاد خلأ در داخل پیست مایعات را به حل آن می کشد.

پیست میکروبی نوعی از پیست است که دقت بیشتری دارد.

لام ۱۰۱:

لام "۱۰۱" آزمایشگاهی یک شیشه ی نازک به ابعاد ۲۶ در ۷۶ میلی متر است. حدود ۱ میلی متر قطر دارد. کاربرد لام میکروسکوپ حکم ظرف آزمایشگاه را دارد که داشتن هر ماده ی قابل آزمایش و بررسی با میکروسکوپ است. ابتدای شنی یا ماده ی مورد نظر بر روی لام میکروسکوپ قرار گرفته و سپس اسلاید را زیر میکروسکوپ قرار می دهیم.

لام میکروسکوپ به شما این امکان را می دهد که چندین ماده یا شنی را بر روی یک اسلاید قرار داده تا در زمان بی آزمایش و بررسی توسط میکروسکوپ صرفه جویی کنید. همچنین استفاده از آن باعث سهولت در جابه جایی ماده مورد آزمایش و انتقال آن در فولدرها می شود.

لام میکروسکوپ معمولاً به همراه لامل که یک قطعه شیشه کوچک و نازک برای قرارگیری بر روی ماده مورد آزمایش است، استفاده می شود.