



مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی

باسمه تعالی



شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران

شماره SOP: BS-VIII	
ویرایش: اول	عنوان SOP: جمع آوری و ذخیره و ارسال نمونه‌های سارس کوروناویروس - ۲ مثبت جهت ارسال به آزمایشگاه‌های تحقیقاتی
تاریخ: اسفند ۱۳۹۸	تهیه کننده: کارگروه بیماری‌های تنفسی
شماره صفحه: ۱ از ۳	تعداد صفحات: ۳

روش عملیاتی استاندارد (SOP) Standard Operating Procedure (SOP) جمع آوری و ذخیره و ارسال نمونه‌های سارس

کوروناویروس - ۲ مثبت جهت ارسال به آزمایشگاه‌های تحقیقاتی

منظور از نمونه در این متن، آندسته از نمونه‌های تنفسی، خون کامل، مدفوع و بیوپسی یا اتوپسی ریه هستند که از بیماران جمع آوری شده و برای سارس-کرونا-۲ مثبت گزارش گردیده‌اند. جمع آوری نمونه‌ها بایستی توسط افراد آموزش دیده و با در نظر گرفتن کلیه دستورالعمل‌های ایمنی مانند استفاده از تجهیزات محافظت شخصی مناسب برای ویروس‌های تنفسی انجام پذیرد. این نکته مهم است که از ذوب و انجمادهای مکرر نمونه خودداری شود. تمام نمونه‌های جمع آوری شده برای تحقیقات آزمایشگاهی باید به عنوان یک نمونه عفونی بالقوه در نظر گرفته شوند. لطفاً اطمینان حاصل گردد که کارکنان مراقبت‌های بهداشتی که نمونه‌ها را جمع آوری می‌نمایند به دقت به دستورالعمل‌های پیشگیری از عفونت و کنترل پایبند باشند.

توجه: تمامی عملیات Aliquot نمودن، جداسازی، استخراج و غیره باید در زیر هود کلاس ۲ (BCL-II) و با رعایت استانداردهای لازم صورت گیرد.

الف- نمونه‌های تنفسی

اگر هدف از انجام تحقیقات در آینده، صرفاً بر تمرکز بر روی ویروس باشد حفظ نمونه اصلی و یا مواد استخراج شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد کفایت. نمونه‌هایی که قبلاً در آزمایشگاه در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند، اگر بیشتر از ۵ روز از زمان ذخیره آنها در این دما نگذشته باشد به شرطی برای نگهداری مناسب هستند که بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری گردند. در صورتی که نمونه‌ها از قبل در این فریزرها نگهداری شده‌اند، شرایط خوبی را دارا خواهند بود.

اگر هدف از تحقیقات در آینده، بررسی بیان ژن، بررسی ترانسکریپتوم و غیره باشد، در این صورت باید تمرکز بر حفظ Total RNA باشد. به محض جدا شدن نمونه از بدن، RNA در معرض تخریب (Degradation) می‌باشد. لذا باید با توسل به راه‌های زیر بهترین شرایط را برای حفظ کیفیت نمونه فراهم نمود:

۱- یکی از بهترین روش‌های ممکن، استخراج RNA و ترجیحاً تهیه cDNA در بدو تحویل گرفتن نمونه و یا همزمان با انجام تست تشخیصی است. cDNA تهیه شده در شرایط ۲۰- و ترجیحاً ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا سال‌ها قابل استفاده خواهد بود. برای حفظ RNA استخراج شده به مدت طولانی، قدم بعدی اضافه نمودن محلول RNAlater به نمونه است. با این عمل، RNA برای مدت ۱ تا ۲ سال در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. نوع تجاری RNAlater در بازار موجود است ولی می‌توان آن را در آزمایشگاه بصورت In-house هم سنتز نمود (مخلوطی از سدیم استات + اتانول خالص + DEPC Water). همچنین از بافر حاوی guanidinium thiocyanate (GTC) به نسبت ۰٫۱٪ (V/V) نیز می‌توان استفاده نمود.

۲- اگر به هر دلیلی انجام مراحل فوق امکان‌پذیر نباشد، می‌توان بعد از انجام تست‌های تشخیصی بر روی نمونه، مابقی آن را بلافاصله در تانک ازت (Liquid Nitrogen) قرار داد. با این عمل تا سال‌ها می‌توان نمونه را حفظ نمود. لیکن نگهداری در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد (که قاعدتاً در بیشتر آزمایشگاه‌های تحقیقاتی وجود دارد) روش قابل قبول بوده و تا سال‌ها می‌توان نمونه اصلی را در این شرایط حفظ نمود.

۳- با هماهنگی به عمل آمده با پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان شریعتی شهر تهران، امکانات نگهداری نمونه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد فراهم گردیده است. طبق موارد اشاره شده در بالا، یا نمونه اصلی و یا RNA/cDNA را می‌توان با در نظر گرفتن شرایط زنجیره سرد با پوشش سه لایه منتقل گردد بدین ترتیب که ویال یا لوله در پیچ‌دار به (عنوان لایه اول) در داخل یک ظرف در پیچ‌دار دیگر قرار گیرد (لایه دوم) و اطراف لوله حاوی نمونه با ابر یا اسفنج حفاظت شود و در داخل یک باکس حمل نمونه (لایه سوم) حاوی یخ قرار گیرد و از طریق هوایی و یا زمینی به پژوهشکده منتقل نمود. اداره صحیح نمونه‌ها در هنگام حمل و نقل ضروری است.

۴- ارجح است که نهایتاً اصل نمونه بالینی و RNA/cDNA استخراج شده در ۲ فریزر جدا از هم حفظ و ذخیره گردند.

ب- نمونه های خونی

در صورتی که مراکز علمی تمایل به ارسال نمونه خونی به منظور بررسی‌های سرولوژیک داشته باشند می‌بایست دو نمونه خون در دوره‌های حاد و نقاهت بیماری (به فاصله زمانی ۲ تا ۴ هفته) از بیمار گرفته و بعد از جداسازی سرم آنرا برای بررسی‌های بعدی، مورد استفاده قرار دهند در این خصوص می‌توانند طبق پروتکل زیر عمل نمایند.

برای نمونه‌های خونی می‌بایست ۳ تا ۵ میلی‌لیتر خون از بیمار گرفته و در لوله جدا کننده سرم (لخته) ریخته اجازه دهید خون کاملاً لخته شود و سپس نمونه را سانتریفوژ کرده تا سرم آن جدا شود و تمامی سرم را در داخل لوله یا ویال‌های در پیچ‌دار انتقال دهید. حداقل ۱ میلی‌لیتر سرم برای آزمایشات در نظر گرفته شود و با Cold packs برای حفظ دمای +۴ درجه سانتی‌گراد ارسال گردند. از کودکان می‌توان ۳ میلی‌لیتر خون برای این منظور گرفت و سعی شود حداکثر سرم جمع آوری شود.

ج- نمونه‌های بافتی از جراحی یا اتوپسی

نمونه‌های بیوپسی یا اتوپسی بدست آمده از ریه می‌بایست در ظرف در پیچ‌دار استریل حاوی سرم فیزیولوژی جمع آوری و به آزمایشگاه ارسال شود. برای نگهداری کوتاه مدت می‌توان نمونه‌های فوق را تا ۲۴ ساعت در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد نگهدار کرد و برای زمان‌های بیش از ۲۴ ساعت لازم است در دمای -۷۰ درجه سانتی‌گراد نمونه نگهداری شود. در صورتیکه قصد بررسی مولکولی برای تشخیص RNA ویروس می‌باشد می‌توان مشابه آنچه در ارتباط نمونه‌های تنفسی اشاره شد، عمل گردد. در تمامی مراحل بایستی به این مورد توجه داشت که نمونه حتماً باید دارای مشخصات (نام بیمار، کد رهگیری نمونه، مشخصات آزمایش، تاریخ نمونه‌گیری، نام مرکز ارسال کننده و ...) باشد که می‌توان این موارد را به صورت یک برچسب (لیبل) بر روی ظرف حاوی نمونه الصاق نمود.

تهیه و تدوین:

مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی

شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران

مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۹۲۶۶۰	شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۹۲۶۶۰
---	--