



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه ایمونولوژی

1

جلسه اول:
خونگیری و جداسازی سرم و پلاسما

روشهای مورد استفاده در خونگیری به عنوان یک هنر محسوب میشود و این هنر به وسیلهی مطالعه و مشاهده و تمرین بدست می‌آید. مهارت، بردباری و قدرت فهم و درک صفات یک خونگیر خوب است.

زمانی که با کودک روبرو هستیم اهمیت موضوع دو برابر می‌شود اگر اولین مرتبه مراجعه برای کودک وحشناک باشد در ذهن او خواهد ماند و برای سالهای متمادی دچار ترس خواهد شد. جلب اعتماد و اطمینان کودک قبل از خونگیری باید مورد توجه قرار گیرد و کودک باید از آنچه که اتفاق خواهد افتاد مطلع گردد.

خونگیری وریدی روزمره را می‌توان با نیش زنبور عسل و یا فرورفتن سوزن در انگشت دست هنگام خیاطی مقایسه نمود.

خونگیری معمولا به دو صورت انجام می گیرد:

۱- نمونه برداری کم (Micro)

۲- خونگیری وریدی (Vien puncture)

نمونه برداری کم (Micro Sampel Technique)

4

نمونه برداری میکرو معمولا بر جمع آوری خون از پوست دلالت می کند و در موارد زیر به کار می رود.

۱- کودکانی که سن آنها کمتر از ۶ ماه است و خون زیاد ندارند و همچنین گرفتن مقدار زیادی خون از ورید آنها خطرناک است.

۲- در بچه های کوچک اگر مقدار کمی خون مورد نیاز باشد با سوراخ کردن نوک انگشت سوم و چهارم دست می توان خون مورد نیاز را بدست آورد.

۳- در افراد بالغ هنگامی که وریدهای بیمار مناسب نیست و یا این که تزریق های وریدی برای بیمار در حال انجام است و یا در بیمارانی که به شدت سوخته اند می توان از انگشت سوم یا چهارم خونگیری کرد.

نکته: در نوزادان در صورتی که نیاز به تهیه سرم از خون باشد و یا برای کشت خون باید از ورید استفاده کرد که در این صورت از ورید گردن (وداج) و یا ورید پا (فمور) استفاده شود.

وسایل مورد نیاز جهت نمونه گیری کم

۱- الکل اتیلیک ۷۰٪

۲- گاز استریل یا پنبه

۳- لانست استریل

۴- لوله های آزمایش مخصوص هر آزمایش



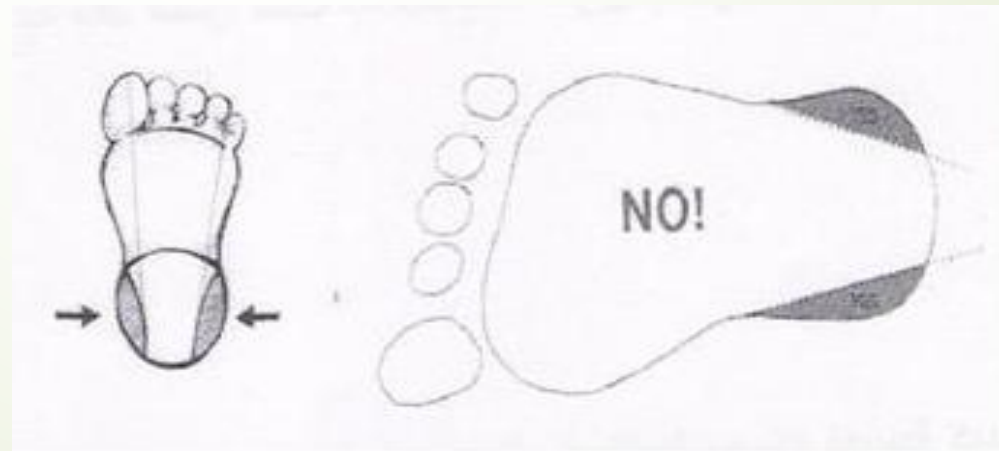
روش خونگیری کم

6

۱- تعیین محل خونگیری هنگامی که از کودکان کمتر از یک سال اقدام به خونگیری می شود، معمولا از پاها خون گرفته می شود محلی که برای خونگیری انتخاب میشود باید قسمت داخلی و خارجی کف پا (پاشنه پا) باشد.

برای پیدا کردن این محل یک خط فرضی از میان انگشت شست پا به طرف پاشنه رسم می کنیم و یک خط هم از بین انگشت چهارم و پنجم به سوی پاشنه پا رسم می کنیم (طبق شکل) منطقه ی پاشنه پا مکانی است که برای خونگیری توصیه شده است هیچ وقت نباید از قسمت انحنای پا برای خونگیری استفاده نمود. عمق سوراخی که در پاشنه ایجاد می شود نباید بیشتر از $2/4$ میلی متر باشد چون که عروق خونی پاشنه پای کودک در فاصله بین $1/6$ - $0/35$ میلی متر زیر سطح پوست قرار دارند.

مناطق قابل خونگیری و غیر قابل خونگیری در پا





تهیه کننده: سهیلا عباسی

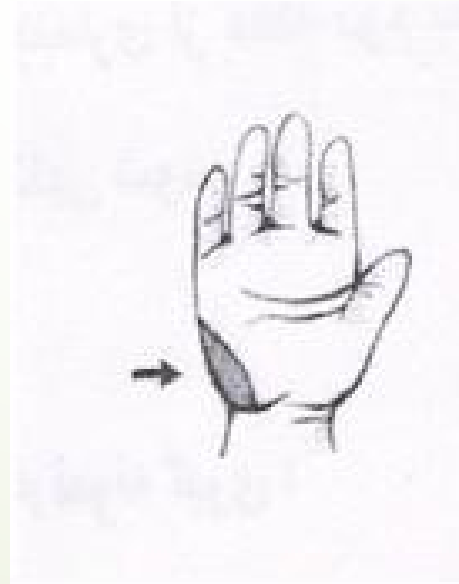
محل خونگیری از سر انگشت

عمق سوراخی که در انگشت ایجاد می شود نباید بیشتر از ۳/۱ میلیمتر باشد.

توجه: محل خونگیری نباید متورم باشد و یا اینکه قبلا از این محل برای خونگیری استفاده شده باشد.

زمانیکه از انگشت دست برای خونگیری استفاده می شود از سر انگشت استفاده می شود.

لانست را طوری می زنیم که نه در سرانگشت باشد و نه در جانب انگشت بلکه مقدار جزئی از مرکز انگشت فاصله داشته باشد.





تهیه کننده: سهیلا عباسی

۲- آماده کردن محل خونگیری

محل خونگیری را می توانیم با ماساژ دادن آماده کنیم. بعد محل را با الکل ۷۰٪ تمیز می کنیم. محل خونگیری را توسط پنبه یا گاز استریل خشک می کنیم (چون باقیمانده الکل در محل باعث همولیز خون می شود).

۳- از لانست یک بار مصرف استفاده می کنیم و بوسیله لانست یک سوراخ در سطح پوست ایجاد می کنیم همین سوراخ سطحی که ایجاد می شود باعث می شود که جریان خون برقرار شود و نیازی به تکرار نیست در صورتی که سوراخ مناسب باشد. ۱-۵/۰ سی سی خون می توان از آن بدست آورد.

۴- با استفاده از یک گاز خشک استریل، قطره اول را پاک می کنیم و مطمئن می شویم که اطراف محل کاملا خشک باشد.

۵- تقریبا یک سانتی متر عقب تر از محل خونگیری یک فشار متوسط وارد می کنیم تا قطره خون خارج شود.

۶- فوراً فشار را از روی محل بر می داریم تا جریان خون دوباره برقرار شود.

۷- لوله جمع آوری نمونه یا پی پت را در وضعیت افقی و مقدار جزئی متمایل نگه می داریم. هنگامی که قطره خون در تماس با لوله قرار گرفت خون باید بصورت آزاد جریان پیدا کند.

۸- مراحل ۵ و ۶ و ۷ را تکرار کنید تا این مقدار خون مورد نیاز جمع آوری شود.

۹- هنگامی که نمونه گیری کامل شد، پا را کمی از سطح بدن بالاتر نگه دارید (انگشت را باید در وضعیت بالا نگه داشت) و با یک گاز استریل روی محل خونگیری فشار وارد کنید تا این که خون ریزی متوقف شود.

خونگیری وریدی

برای خونگیری ورید باید دقت خاصی انجام شود وریدهای بیمار منبع اصلی خون برای انجام آزمایشات، درمان، تزریق محلولهای وریدی و انتقال خونی است. به علت اینکه فقط وریدهای بیمار به آسانی در دسترس هستند. بنابراین اهمیت دارد که خونگیری در شرایط مناسب و خوب انجام پذیرد.

روش ایده ال این است که بیمار در وضعیت درازکش باشد. و اگر این وضعیت امکان پذیر نیست. بیمار باید روی صندلی راحت که دو طرف آن دسته دار است قرار بگیرد و به آسانی در دسترس تکنسین باشد. باید برای غشهای احتمالی بیمار آمادگی لازم را داشته باشد.

وسایل مورد نیاز :

۱- الکل ایزوپروپیل ۷۰٪ یا اتانول ۷۰٪

۲- گاز استریل

۳- تورینکت یا گارو

۴- پی پت ها یا لوله های مخصوص برای آزمایش های مورد نظر

۵- سرنگ با سوزن

انتخاب سوزن بستگی به اندازه ورید دارد. سوزنی که به طور معمول مورد استفاده قرار می گیرد. سوزن شماره (20 Gage) است. برای وریدهای کوچک سوزنهای شماره ۲۱-۲۲ توصیه می شود.

- ۱- ابتدا اطمینان حاصل می‌کنیم بیمار را درست تشخیص داده‌ایم به همین منظور زمانی که از بیماری خون گرفته می‌شود از او می‌خواهیم که نامش را تکرار کند و بعد با برچسب لوله آزمایش چک می‌کنیم.
- ۲- یک یا دو مرتبه پیستون سرنگ را به طرف عقب و جلو می‌بریم تا مطمئن شویم که چسبیده نیست سپس همه هوای درون سرنگ را خارج می‌کنیم سوزن را در داخل سرنگ قرار می‌دهیم و مطمئن می‌شویم که محکم است. در ضمن قسمت اریب نوک سوزن باید به طرف بالا باشد.



تهیه کننده: سهیلا عباسی



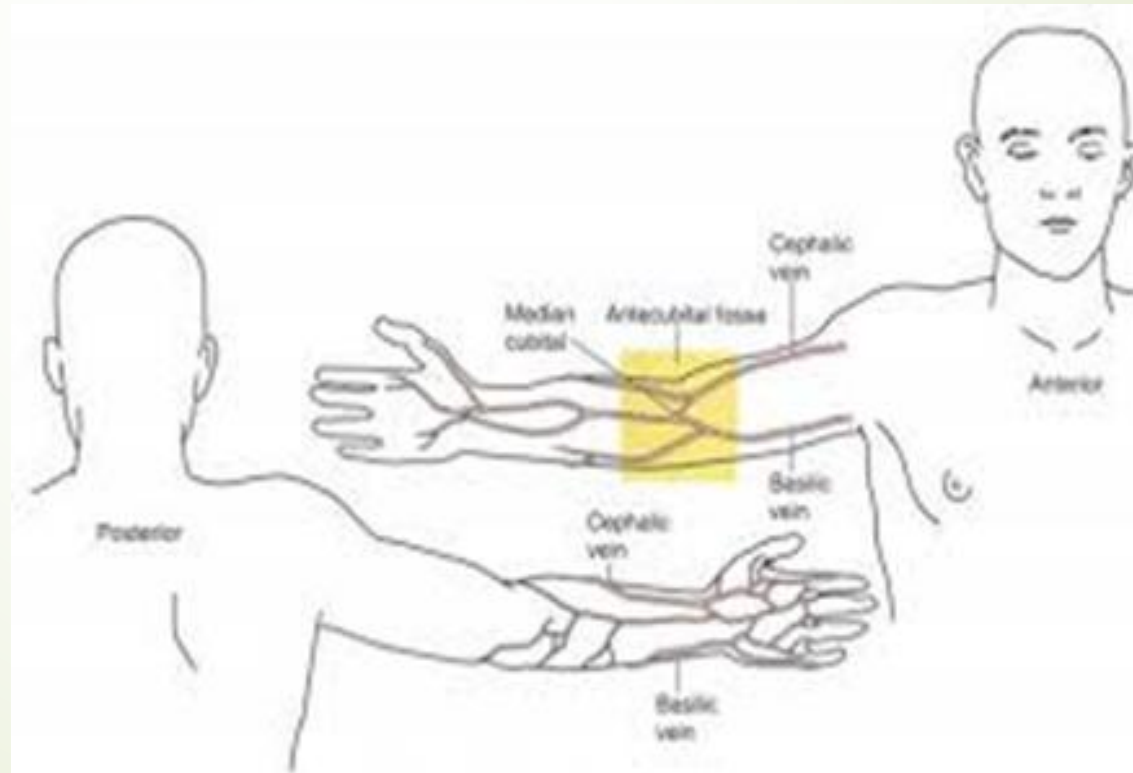
- ۳- تورنیکت را چند اینچ بالاتر از آرنج طوری می بندیم که بیمار کمتر احساس ناراحتی کند.
- ۴- از بیمار می خواهیم که دست خود را کاملا مشت کند و این باعث می شود که ورید بیشتر محسوس و برجسته شود.



۵- یک ورید برای خونگیری انتخاب می‌کنیم. سه ورید عمده در بازو وجود دارد که مکانهای عمده خونگیری وریدی هستند.

وریدهای عمده بازو

و عبارتند از *Accessory cephalic* , *Mediam cephalic* , *Mediam cubital* بطور کلی ورید *Median cubital vein* ورید انتخابی است چون اغلب بسیار خوب در بافت لنگر می‌اندازد و هنگام خونگیری حرکت نمی‌کند. ورید *Cephalic vein* که در قسمت داخلی بازو قرار دارد. کمی سفت‌تر است.





تهیه کننده: سهیلا عباسی

➤ ۷- با استفاده از انگشت سبابه دست، بازو را لمس کنید تا بهترین ورید را به دست آورید و باید ورید زیر دست شما به صورت یک لوله پلاستیکی حس شود. (خطایی که غالباً رخ می دهد. عدم یافتن یک ورید مناسب است این امر ناشی از دقت ناکافی و یا شتاب و عجله است.)

➤ اگر ورید به آسانی محسوس و قابل لمس نیست یکی از چند تکنیک زیر را می توان به کار برد تا ورید مشخص شود.

➤ الف) دست را از سمت مچ به طرف آرنج ماساژ دهید و با این عمل ورید بازو را پر خون کنید.

➤ ب) بوسیله انگشت سبابه و انگشت سوم روی ورید ضربه وارد کنید تا ورید منبسط شود.

➤ ج) یک پارچه مربوط گرم روی ورید قرار دهید.

د) ورید را در وضعیت عمود قرار دهید تا کل ظرفیت آن از خون پر شود.

۸) زمانی که ورید انتخاب نمودید، محل خونگیری را با الکل ۷۰٪ تمیز کنید، اجازه دهید تا محل خشک شود. چون این امر باعث شود که خون همولیزه نشود و همچنین از احساس سوزش غیر استریل یا انگشت لمس شود.

۹- بازوی بیمار را در حدود ۱-۲ اینچ زیر منطقه خونگیری محکم در دست بگیرد و پوست را به وسیله انگشت شست بکشید.



تهیه کننده: سهیلا عباسی

۱۰- سرنگ یا هر وسیله دیگری که بوسیله آن خونگیری انجام می‌شود را بین انگشت شست و سه انگشت شست و سه انگشت آخر قرار دهید.

۱۱- سوزن باید در وضعیت مایل قرار گیرد. (قسمت سوراخ دار سوزن به طرف بالا باشد) و در همان وضعیت مایل با زاویه تقریبا ۱۵ درجه وارد رگ شود.

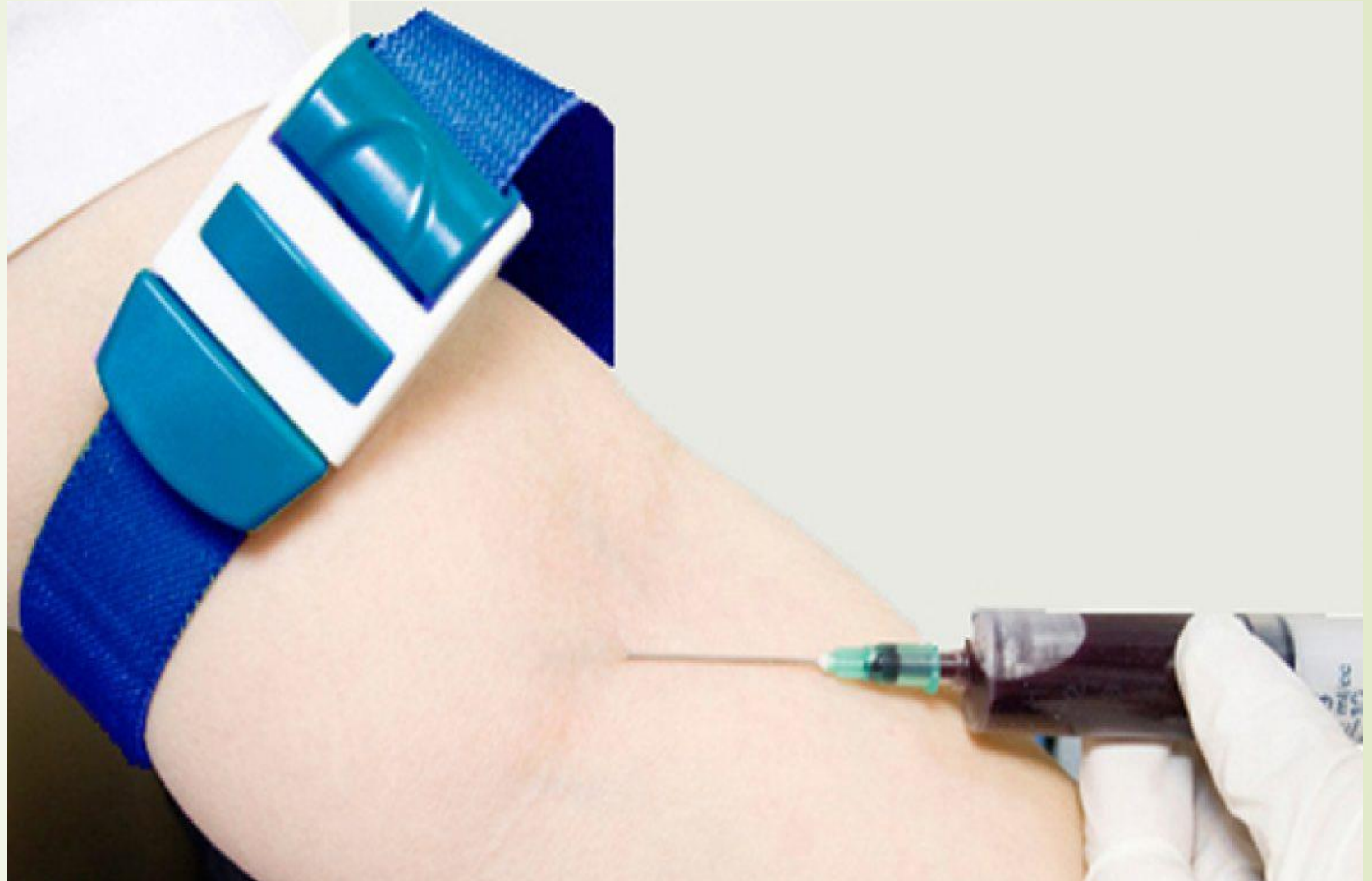
۱۲- سوزن باید مقدار کمی پائین تر از ورید وارد شود و بافت به عنوان لنگرگاه سوزن است.

۱۳- اگر ورید برجسته باشد، خونگیری از پوست یا ورید ممکن است. با یک مرتبه انجام شود. ولی اگر ورید عمقی تر باشد. سوزن مشکل تر و با دو مرتبه وارد ورید می‌شود. به این صورت که ابتدا پوست سوراخ می‌شود و در صورت نیاز، انگشت نشانه دست چپ ممکن است برای تثبیت محل دقیق خونگیری از ورید مورد استفاده قرار گیرد. و در مرحله دوم ورید سوراخ می‌شود.

۱۴- همانطور که سوزن وارد ورید می‌شود، یک مقاومت نسبتا جزئی احساس می‌شود.

۱۵- اگر از سرنگ استفاده می‌شود. همانطور که سوزنی وارد ورید می‌شود. مقدار کمی خون وارد گردن سرنگ می‌شود زمانی که پیستون سرنگ به عقب کشیده می‌شود باید دقت کافی به عمل آید و با نیروی زیاد به عقب کشیده نشود چون باعث همولیز می‌شود.





تهیه کننده: سهیلا عباسی

۱۶- به محض اینکه خون وارد لوله یا سرنگ می شود. می توان تورنیکت را شل نمود و یا اینکه تا کامل شدن خونگیری آن را به همان حال رها نمود. به هر حال باید توجه داشته باشید که نباید تورنیکت را پیش از یک دقیقه روی دست باقی بگذارید. چون باعث افزایش تعداد سلولهای خونی یا Hemoconcentration می شود. (در صورت تمایل به محض اینکه خون جاری شد بیمار می تواند مشت خود را باز کند).

۱۷- به محض اینکه خون مورد نیاز گرفته شد، و قبل از اینکه سوزن از ورید خارج شود تورنیکت را آزاد کنید.

۱۸- یک عدد گاز استریل و خشک روی محل خونگیری قرار دهید و به آهستگی و یکنواخت سوزن را از ورید بازوی بیمار خارج کنید.

۱۹- توسط بیمار به مدت چند دقیقه بازویش را در وضعیت عمودی به طرف بالا نگه دارد، این عمل باعث کاهش فشار بر روی عروق خونی می شود.

۲۰- بلافاصله سوزن را از سورنگ جدا می کنیم و خون را در داخل لوله های مناسب خالی می کنیم. این عمل را به سرعت قبل از لخته شدن خون انجام می دهیم.




تهیه کننده: سهیلا عباسی

تذکره ۱: در صورتی که موفق به خونگیری سریع از ورید نشدید از انگشت نشانه برای تعیین محل ورید استفاده کنید و این امکان وجود دارد که سوزن به اندازه کافی وارد ورید نشده باشد و یا اینکه مقدار جزئی به سمت راست یا چپ وارد شده باشد سعی نکنید که در همان محل خونگیری را انجام دهید. زیرا این امر برای بیمار دردناک است و ممکن است باعث آسیب بافتی شود در این امر سوزن را تا سطح پوست بیرون بکشید و دوباره بطور مستقیم وارد کنید. این روش در صورتی مورد قبول است که سوزن نزدیک ورید باشد. اما دقت کافی به عمل آید تا باعث درد بیشتر نشود و در بعضی مواقع خونگیری مجدد مورد نیاز است.

تذکره ۲: اگر در حین خونگیری، شروع به متورم شدن نمود معمولا نشان دهنده این است که سوزن از ورید عبور کرده و یا این که از ورید خارج شده است و خون درون بافت نفوذ کرده است در این حالت باید تورنیکت باز شود و سوزن سریعا از ورید خارج گشته و محل خونگیری فشار داده شود.



تهیه کننده: سهیلا عباسی



Phlebotomy: Syringe Draw Procedure

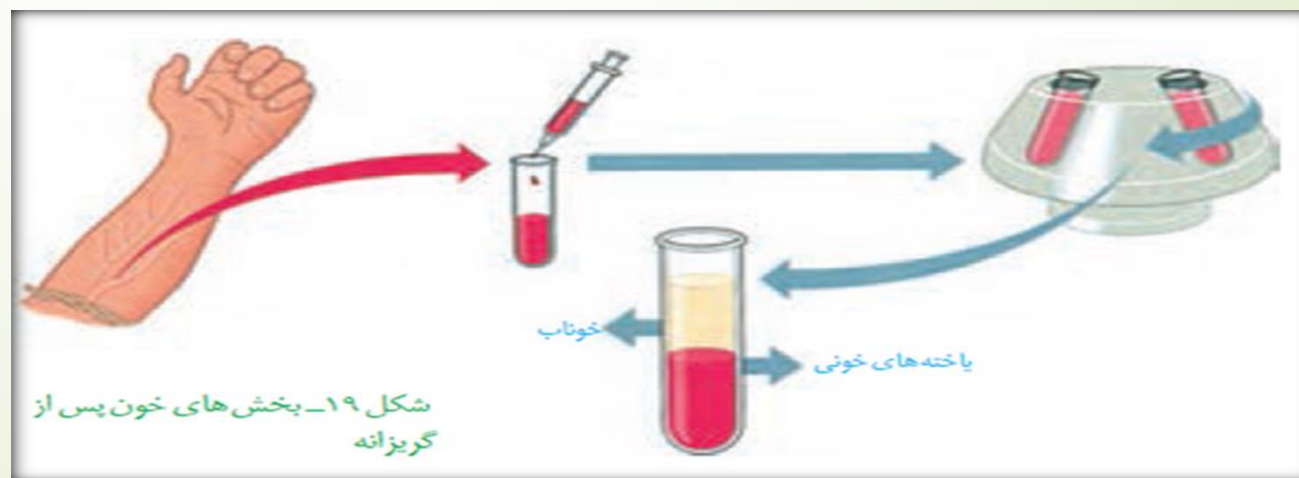
aparat.com/labtube

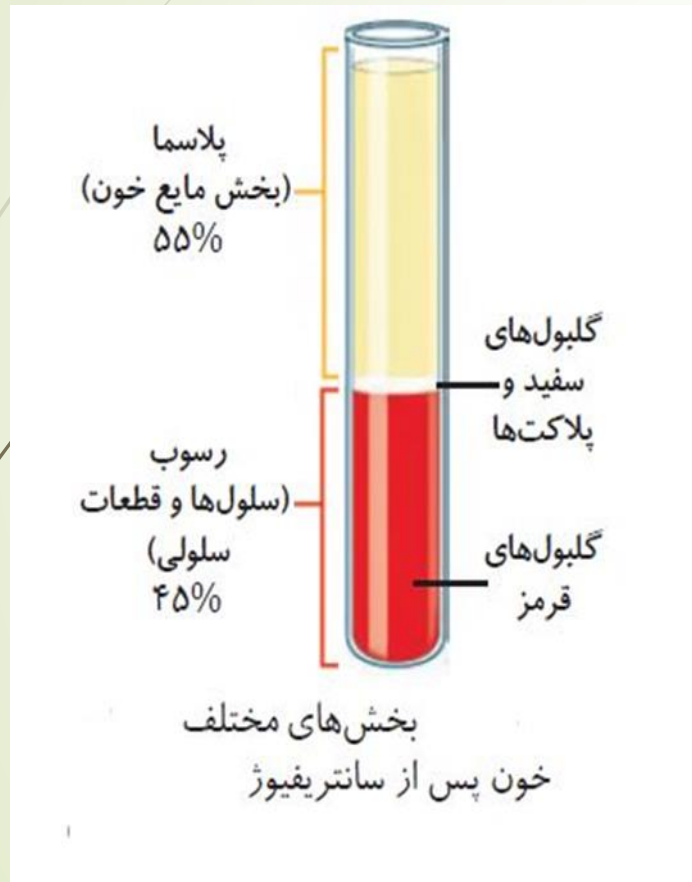
تهیه کننده: سهیلا عباسی

جداسازی سرم و پلاسما

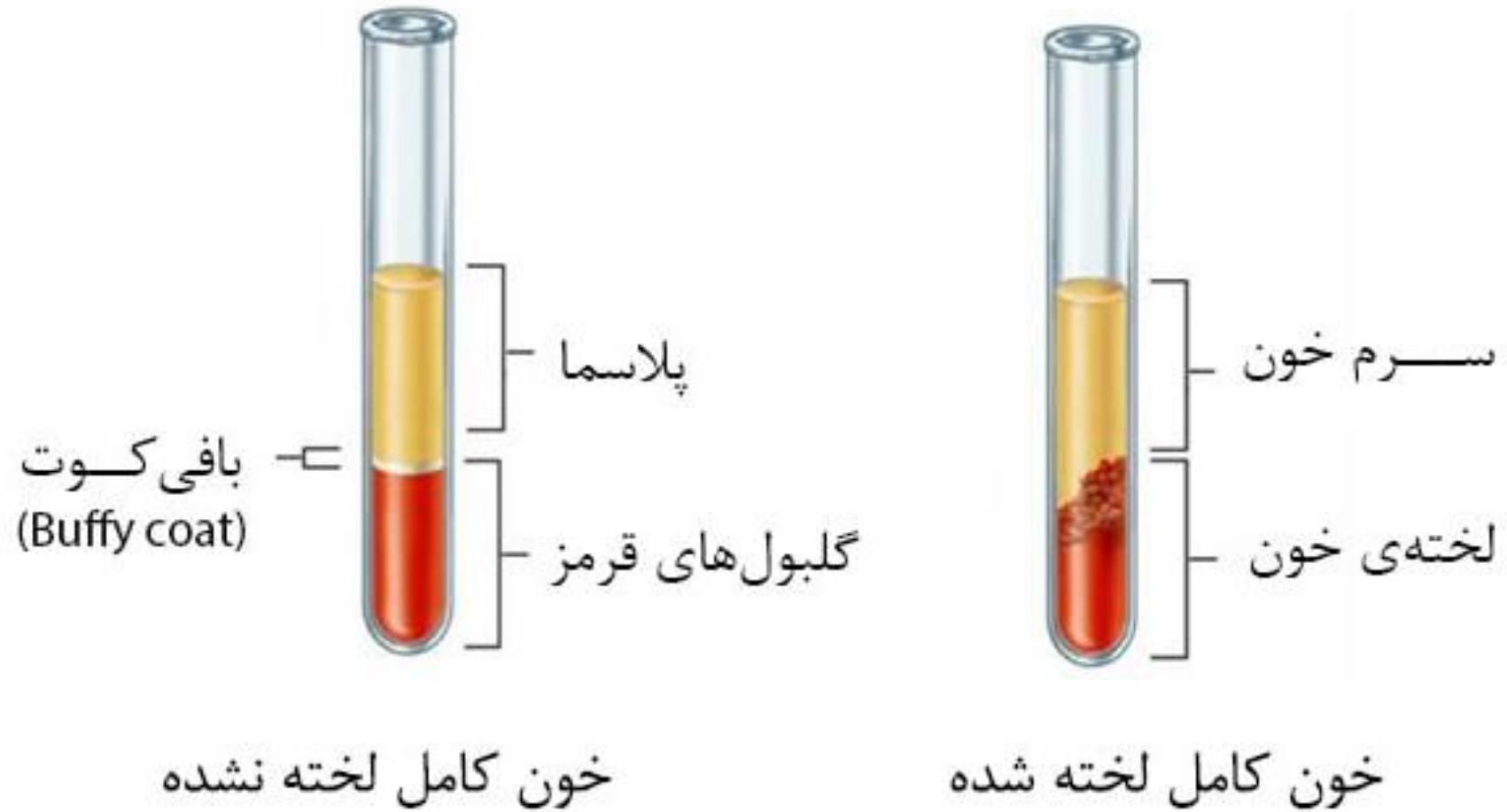
➤ اغلب آزمایشات سرولوژی بر روی سرم انجام می‌شود و برای جداکردن سرم نیاز به استفاده از ماده ضد انعقاد نمی‌باشد.

➤ بعد از گرفتن خون آن را درون لوله شیشه‌ای ریخته و به صورت صاف درون جا لوله‌ای به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و بعد با اپلیکاتور چوبی یا پلاستیکی لخته را از اطراف لوله جدا کرده اصطلاحاً آن را (declot) کرده یا لخته را آزاد می‌کنیم و لوله را درون سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ (rpm) قرار می‌دهیم. سپس دستگاه را خاموش کرده و لوله را بدون آنکه تکان بخورد بیرون می‌آوریم.





۳ لایه مشخص است: مایع رویی که زرد رنگ و شفاف است بنام سرم برای آزمایشات سرولوژی از آن استفاده می‌شود، لایه سفید و نازکی که زیر آن قرار دارد به نام **Buffy coat** نامیده می‌شود و شامل گلبول‌های سفید است و زیر آن رسوب گلبولی که شبکه لخته شده گلبول‌های قرمز را شامل می‌شود سرم را با استفاده از پی‌پت یا سمپلر بیرون می‌آوریم بطوری که با رسوب گلبولی مخلوط نشود.



گاهی اوقات برای تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز ما نیاز به خون تام و یا پلاسما داریم بنابراین به محض اینکه خون گرفته شده باید با ضد انعقاد مخلوط شود. معمولا سه نوع ضد انعقاد برای آزمایشات هماتولوژی به کار می رود.

EDTA (اتیلن دی آمین تترااستیک اسید) : نمک سدیم یا پتاسیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید است.

این ضد انعقاد مورد استفاده وسیع برای اغلب آزمایشات هماتولوژیک دارد. نمک دی پتاسیم آن بیشتر از نمک دی سدیم آن در آب حل می شود. میزان مصرف آن 1.5 ± 0.25 میلی گرم به ازاء هر میلی لیتر خون است.

EDTA با کلسیم ترکیب می شود و با این روش از انعقاد خون جلوگیری می کند (کلسیم یک فاکتور لازم برای انعقاد خون است) چون این ضد انعقاد مانع از ایجاد اشکال تکنیکی در تهیه گسترشهای خون می شود. بنابراین در تهیه لامهای خونی حتی ۲ ساعت پس از خونگیری می توان از آن استفاده نمود.

۲- سیترات سدیم (Sodium citrate) ➡

سیترات سدیم، یک ضد انعقاد انتخابی برای مطالعاتی عوامل انعقادی است میزان مصرف آن یک حجم سیترات سدیم 0.109 مول به ازای هر 9 حجم خون تام است. سیترات سدیم بوسیله اتصال با کلسیم مانع از انعقاد خون می‌شود و به پایدار ماندن بعضی از فاکتورهای انعقادی مثل فاکتور V و $VIII$ کمک می‌کند. همچنین این ضد انعقاد در باقی ماندن قدرت پلاکها موثر است

۳- هپارین (Heparin) ➡

میزان مصرف آن 15 واحد بین المللی به ازاء هر میلی لیتر خون است (15 ± 2.5 Iu/ml) این ضد انعقاد در مدت تقریبا 24 ساعت با غیرفعال کردن فاکتور X, II فعال مانع از انعقاد خون می‌شود.

استفاده از هیپارین به عنوان ضدانعقاد ممکن است. باعث توده شدن گلبولهای سفید پلاکتها شود بنابراین مورد استفاده محدودی در هماتولوژی دارد. در سرولوژی به صورت متداول از این ضدانعقاد استفاده می‌شود بعد از اضافه کردن ضد انعقاد آن را سانتریفیوژ می‌شود بعد از اضافه کردن ضد انعقاد آن را سانتریفیوژ می‌کنیم که در این حالت دو لایه تشکیل می‌شود:

مایع رویی که کدر می‌باشد به نام پلاسما (حاوی سرم + فیبرینوژن) و لایه زیری که رسوب گلبولها است و برای تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز کاربرد دارد. علت استفاده سرم یه جای پلاسما در آزمایشات سرولوژی این است که پلاسما حاوی فیبرینوژن است که می‌تواند واکنشهای مثبت کاذب بدهد

با تشکر از حسن توجه شما