



اصول نمونه برداری

تدوین و ارائه: دکتر سیاوش احمدی نوربخش
متخصص جراحی دامپزشکی
پژوهشگر و مشاور کمیته ملی اخلاق در پژوهشهای زیست پزشکی

- شناخت انواع روشهای نمونه برداری
- انتخاب روش با توجه به نیازهای پژوهش
- الزامات اخلاقی در نمونه برداری

- اصول خونگیری در پژوهش
- حجم، محل، سرعت، جایگزینی حجم خون برداشت شده

- علایم خونگیری بیش از حد

- مدیریت نمونه‌ها

اهداف

• نمونه برداری همزمان (real-time):

• اندازه گیری فشار خون، ضربان قلب، تعداد تنفس، ECG

• اخذ نمونه و اندازه گیری آتی:

• خون

• مایع مغزی نخاعی

• مغز استخوان

• شیر

• ادرار و مدفوع

• و ...



انواع نمونه برداری

• تناسب روش با نیازهای پژوهش

• تناسب روش با الزامات اخلاقی

اصول کلی نمونه برداری صحیح

• چه نوع نمونه‌هایی لازم است؟

- تا حد امکان تمام نمونه‌های لازم برای یک بحث قوی در مقاله
- مثلاً در مطالعه خونریزی: نمونه خون (خون کامل، پلاسما و سرم)، فشار خون لحظه‌ای، تعداد ضربان قلب، میزان اکسیژن‌زاسیون خون، حجم خونریزی، میزان زنده‌مانی.

• خون کامل، سرم، پلاسما یا تمام موارد؟

- حسب آزمایشات مورد نظر: خون کامل برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید، سرم برای اندازه‌گیری میزان لاکتات، پلاسما برای اندازه‌گیری میزان لاکتات(!)

• نمونه خون هپارینه یا سیتراته یا هر دو؟

- بستگی به ماهیت تست (کیت لاکتات راندوکس جهت خون هپارینه) و نوع ابزار اندازه‌گیری (گازهای خون با دستگاه Stat Profil® Nova Biomedical نیازمند خون هپارینه)

• حجم نمونه حسب تستهای مورد نظر و روش اندازه‌گیری

- دستگاه اتوآنالایزر با ۰/۲ میلی‌لیتر حدود ۲۰ پارامتر- تستهای دستی جهت هر پارامتر حدود ۱ میلی‌لیتر نمونه.

- حجم بالاتر: افزایش انطباق نمونه با وضعیت حیوان + معضلات اخلاقی

تناسب روش نمونه‌برداری با نیازهای پژوهش

- محل نمونه گیری
 - خون شریانی یا وریدی؟
 - کدام رگ (گردن، دست یا پا)؟
- زمان اخذ نمونه
 - فقط آغاز و پایان طرح، یا نمونه برداری در طول طرح
 - فواصل زمانی؟
- میزان رعایت آسپسی در نمونه برداری؟
 - نمونه استریل یا تمیز یا آلوده؟
- نحوه نگهداری نمونه؟
 - فریز سریع در نیتروژن مایع (-196°C)
 - محلول آب و یخ (سرنگ گازهای خون)
 - نگهداری در دمای اتاق
 - ظرف نمونه (شیشه‌ای، پلاستیکی، ...)
- بررسی اثرات نمونه برداری بر پارامترهای دیگر حیوان
 - برداشت حجم زیاد نمونه خون موجب افت ناگهانی فشار خون و تغییرات آبخاری در سایر پارامترها
- وضعیت خاص هر نوع نمونه
 - خون خرگوش به راحتی در اثر حرکات ناگهانی ظرف نمونه، لیز می‌شود.
 - خونگیری از سوزن بسیار باریک می‌تواند منجر به لیز شدن خون شود.
- جبران حجم خون برداشت شده

تناسب روش نمونه برداری با نیازهای پژوهش (ادامه)

- مثلاً خونگیری به میزان ۱ میلی لیتر از موش کوچک و زنده نگاه داشتن حیوان؟!
- خونگیری از قلب حیوان هوشیار؟!
- خونگیری از قلب حیوان بیهوش و بعد به هوش آوردن و زنده نگاه داشتن حیوان؟!
- بیهوشی روزانه برای نمونه برداری؟!
- قرار دادن کاتتر بلندمدت یا سوزن زدن به حیوان برای هر بار خونگیری؟!
- نمونه برداری از شیر حیوانات شیرده.
- پاداش دادن به حیوانات پس از نمونه گیری (نوازش، خوراک تشویقی، قرار دادن در محوطه بازی و فعالیت).

تناسب روش نمونه برداری با الزامات اخلاقی

بهرتر است ملاحظات ویژه (علمی/اخلاقی) در
نمونه برداری

—چنانچه خیلی واضح و معمول نباشند—
در قسمت روش کار یا بحث مقاله ارائه شوند.



- Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C.R., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B.P. and Deschl, U., 2003. **Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice–part 1:** a joint publication of the RITA and NACAD groups. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(2-3), pp.91-106.
- Kittel, B., Ruehl-Fehlert, C., Morawietz, G., Klapwijk, J., Elwell, M.R., Lenz, B., O'Sullivan, M.G., Roth, D.R. and Wadsworth, P.F., 2004. **Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice–Part 2:** A joint publication of the RITA) and NACAD) groups. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(6), pp.413-431.
- Morawietz, G., Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Bube, A., Keane, K., Halm, S., Heuser, A. and Hellmann, J., 2004. **Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice–Part 3:** A joint publication of the RITA) and NACAD) groups. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(6), pp.433-449.

اصول نمونه برداری بافتی

- Parkinson, C.M., O'Brien, A., Albers, T.M., Simon, M.A., Clifford, C.B. and Pritchett-Corning, K.R., 2011. **Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice.** JoVE (Journal of Visualized Experiments), (54), p.e2966.
- Slaoui, M. and Fiette, L., 2011. **Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation.** In *Drug safety Evaluation* (pp. 69-82). Humana Press.

اصول نمونه برداری بافتی



- راههای مختلف:
- ورید
- شریان
- عروق پشت حدقه
- قلب
- قطع سر



اصول خونگیری

• با توجه به:

- حجم مورد نیاز
- هدف از خونگیری و نوع خون مورد نیاز (تیره یا روشن)
- مدت خونگیری
- دفعات خونگیری
- زنده نگاه داشتن حیوان؟



انتخاب محل خونگیری

- قانون کلی: حداکثر ۱٪ وزن بدن حیوان سالم و با جثه متوسط یا تقریباً ۸ ml/kg خون در هر بازه زمانی دو هفته‌ای.
- خونگیری مکرر هر ۲۴ ساعت، حداکثر ۱٪ از حجم خون در گردش در هر روز (تقریباً معادل ۰/۶ ml/kg در روز).
- به شرطی که مقدار کلی آن در طول زمان، از مقدار گفته شده در بند قبل تجاوز نکند.
- سرعت خونگیری **مهم** است:
- مثلاً اخذ ۴۰٪ از حجم کلی خون رت به مرور و ظرف ۲۴ ساعت و تکرار آن دو هفته بعد، موجب آثار بیماری‌زایی عمده نمی‌گردد. اخذ همین میزان ظرف یک دقیقه موجب مرگ حیوان می‌شود.

حجم خون قابل برداشت

حجم خون*	گونه
۷۵ ml/kg	اسب
۷۰ ml/kg	بز
۶۷ ml/kg	جربیل
۶۰ ml/kg	پرنده کوچک
† ۵۵-۶۵ ml/kg § ۴۴-۷۰ ml/kg	خرگوش
† ۶۹-۷۵ ml/kg	خوکچه هندی
۷۵ ml/kg	راسو
۷۹-۹۰ ml/kg	سگ
۶۰ ml/kg	گاو
۴۷-۶۶ ml/kg	گربه
۶۰ ml/kg	گوسفند
§ ۷۰ ml/kg	مارموزت
۵-۷ ml/ ۱۰۰ g † ۶ ml/ ۱۰۰ g § ۴/۶ ml/۱۰۰ g	موش رت
۷/۸-۸ ml/ ۱۰۰ g † ۵/۸۵ ml/ ۱۰۰ g § ۷/۲ ml/ ۱۰۰ g	موش سوری
۵۴ ml/kg § ۵۶ ml/kg	میمون رزوس
۷۸ ml/kg	همستر

- سرم رینگر یا رینگر لاکتات: سه برابر حجم خون برداشت شده.
- بخش عظیمی از این مقدار ظرف چند ساعت از سیستم گردش خون خارج شده، لذا جایگزین ایده آل نمی باشد.

- محلول ماکروملکول (مثلاً پلاسِمیون): معادل حجم خون برداشت شده.
- مدت زمان بیشتری نسبت به محلولهای کریستالوئیدی در سیستم گردش خون باقی می ماند.



جایگزین کردن حجم خون برداشت شده

- عواقب کوتاه مدت:
 - برداشت ۱۰٪ حجم خون در گردش: آغاز مکانیسم‌های همئوستاتیک
 - برداشت ۲۰-۱۵٪: کاهش برونده قلبی و کاهش فشار خون
 - برداشت ۴۰-۳۰٪: شوک هیپوولمیک مشهود
 - برداشت بیش از ۴۰٪: مرگ نیمی از حیوانات
- عواقب دراز مدت برداشت مکرر حجم‌های کوچک:
 - کم‌خونی (آنمی)

عواقب خونگیری بیش از حد

- شوک هیپوولمیک از نوع هموراژیک:
 - غشاهای مخاطی خشک و رنگ پریده
 - سرد شدن پوست و اندامهای انتهایی
 - افت دمای بدن
 - تغییر ناگهانی در عمق بیهوشی
 - افت فشار خون
 - پالس شریانی سریع و جهنده
 - بی‌قراری در حیوانات هوشیار
 - افزایش تنفس (هیپرونتیلیسیون)
 - تغییر نکردن هماتوکریت و دیگر پارامترهای هماتولوژیک در مراحل اولیه

علایم بالینی زود هنگام



• علائم کم خونی (آنمی):

- رنگ پریدگی غشاهای مخاطی
- رنگ پریدگی گوش
- رنگ پریدگی بالشتک‌های کف پا
- عدم تحمل فعالیت
- بی‌حالی و ضعف
- افزایش تعداد تنفس
- تغییرات مشهود هماتولوژیک

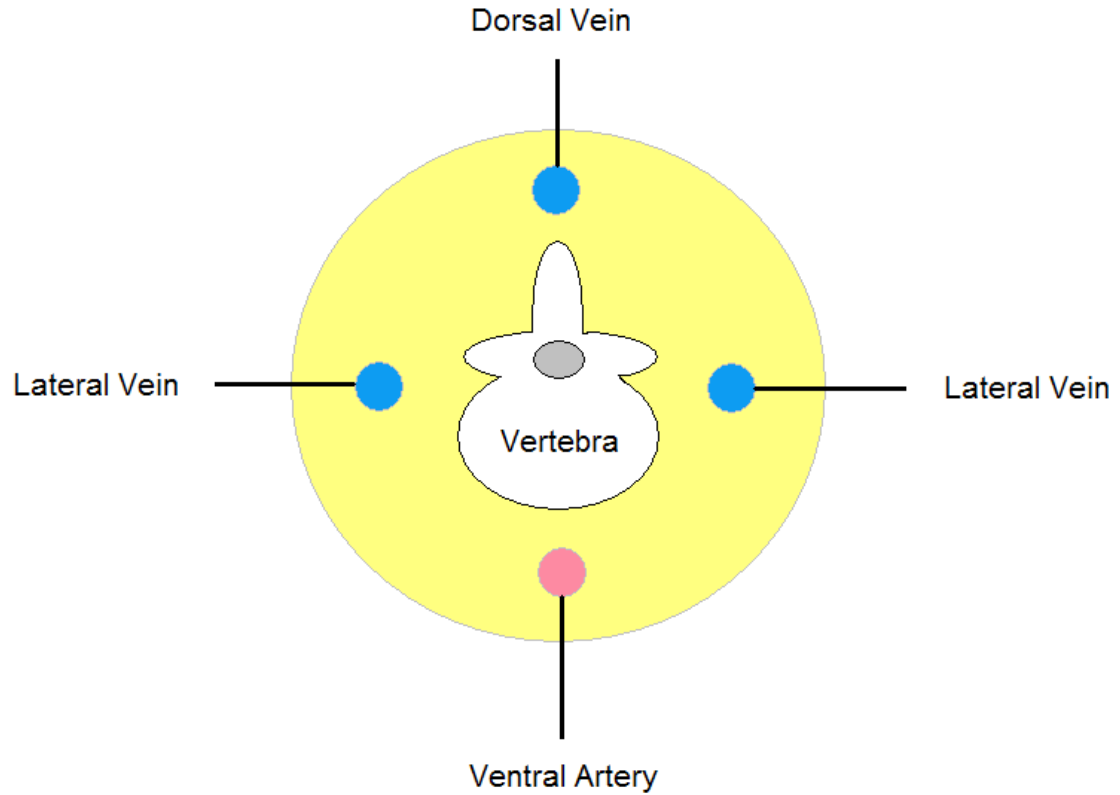
علائم بالینی متأخر

- توجه به حدت انواع روش‌های خونگیری
- آثار دیسترس بر شمارش گلبول‌های خونی
- آثار داروهای آرام‌بخش و بیهوشی بر شمارش گلبول‌های قرمز خون
 - زایلازین، استیل پرومازین، دیازپام، باریتورات‌ها
 - اتساع عروق محیطی با برخی داروها
 - استیل پرومازین
- نسبت حجم ضد انعقاد به حجم خون برداشته شده

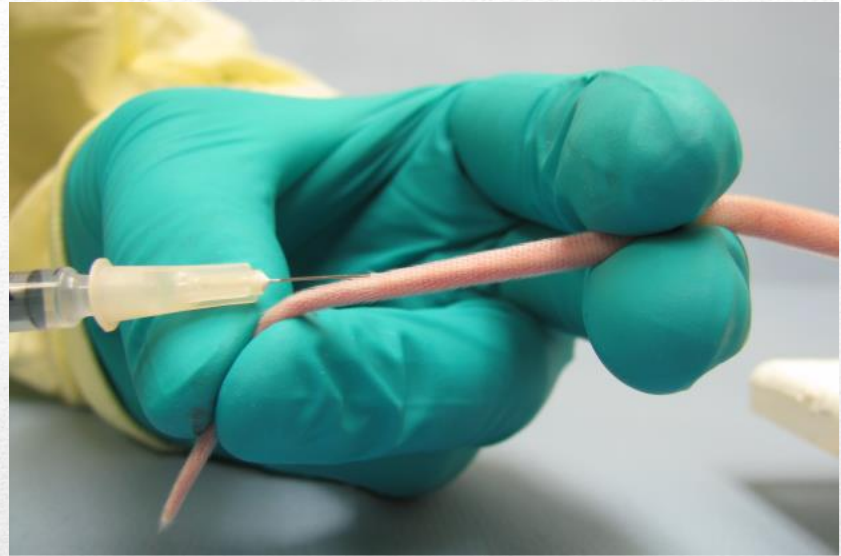
سایر نکات

- انقیاد مناسب
- تراشیدن موها
- برجسته‌سازی رگ
- ضد عفونی (الکل: ضد عفونی و دید بهتر)
- توجه به ساکن نماندن خون در رگ هنگام نمونه برداری
- خونبندی کافی در پایان

اصول کلی خونگیری

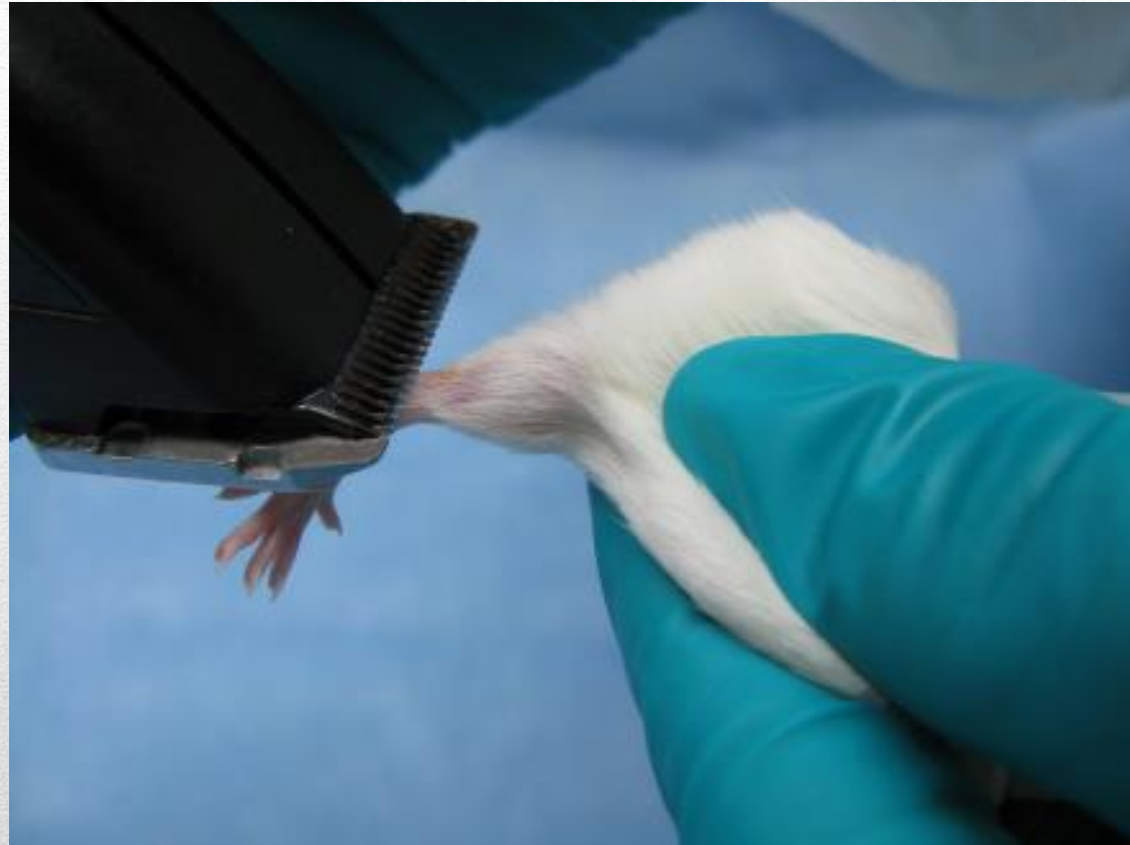


دستیابی وریدی (IV)



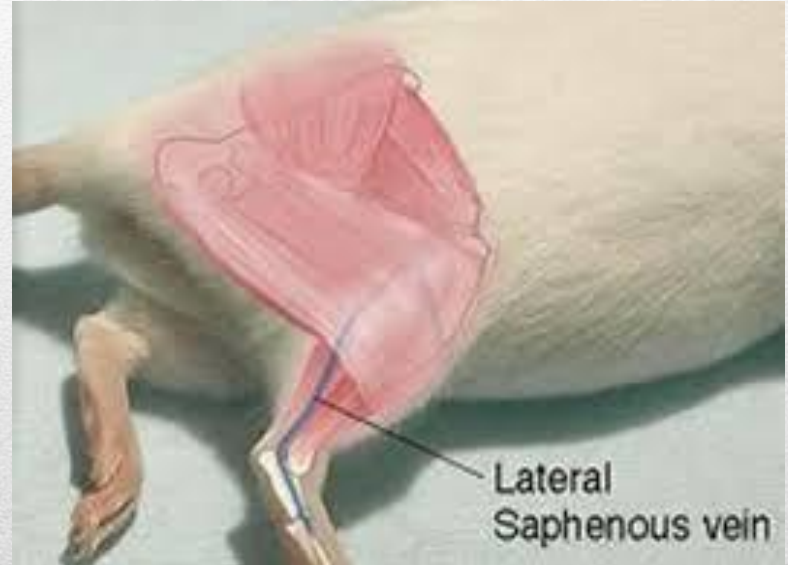


خونگیری از ورید پا

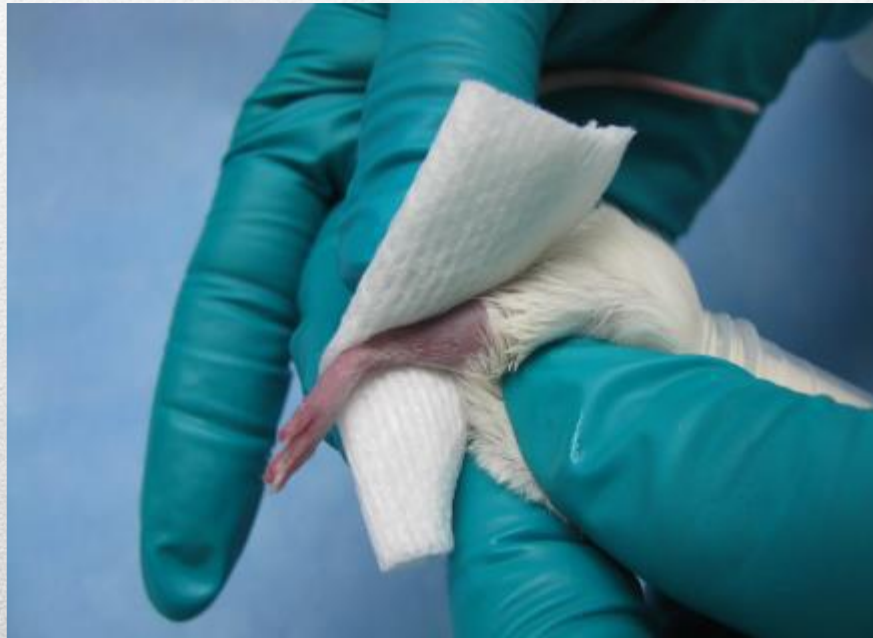


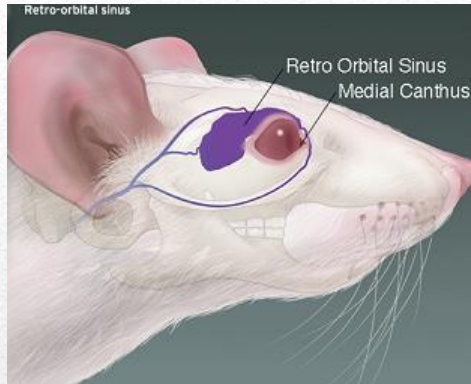
- تراشیدن موها و مالیدن وازلین بر روی پوست در محل مورد نظر برای نیشتر زدن به رگ





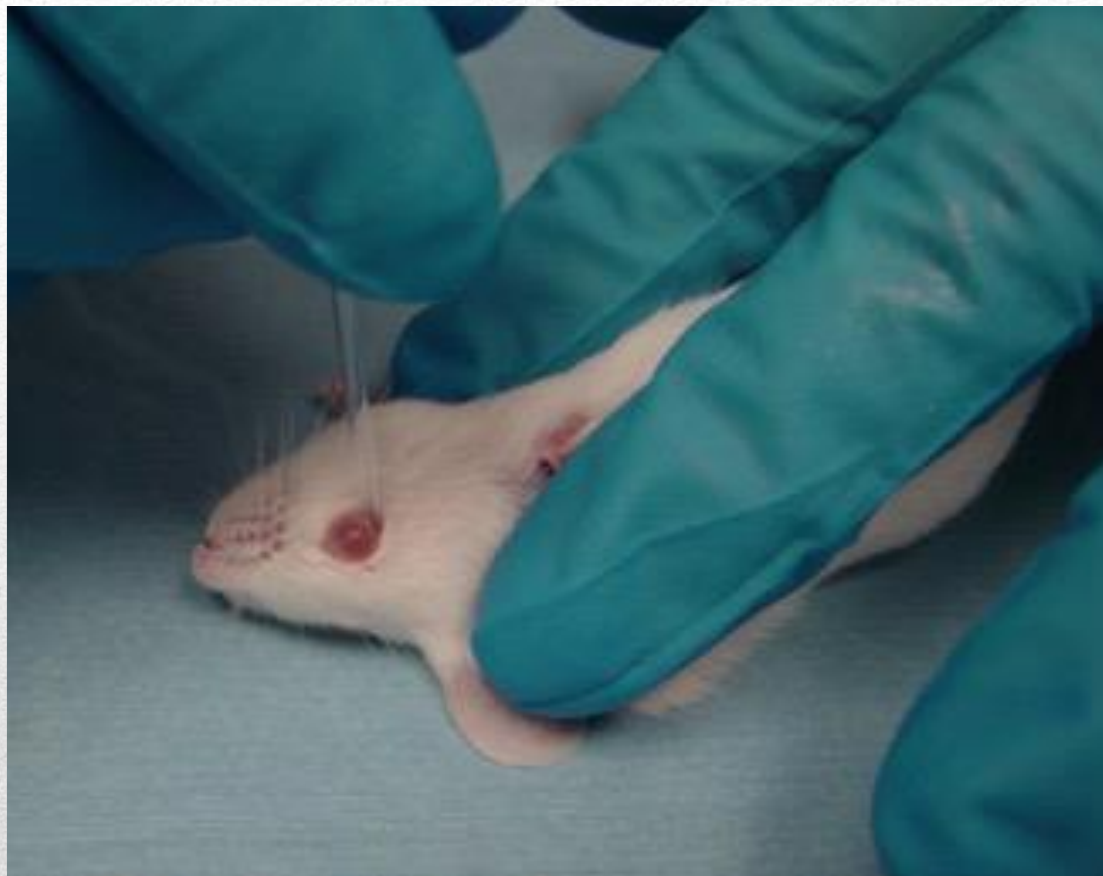






- حداکثر دو بار خونگیری از هر چشم
- حداقل ۷ روز فاصله بین خونگیری‌ها
- باید تحت بیهوشی عمومی و بی‌دردی انجام شود و ضمناً یک قطره بی‌حسی موضعی چشم مثل تتراکائین یا پروپاراکائین در چشم چکانده شود.

خونگیری از سینوس خلف حدقه‌ای موش کوچک



- بسیار دردناک
- آسیب به عروق کرونر قلب، آنفارکتوس میوکارد، فیبریلاسیون بطنی، تامپوناد قلبی، پارگی لوب‌های ریه، بروز پنوموتوراکس، و خونریزی داخل ریوی
- رنج شدید برای حیوان

• لذا خونگیری از قلب فقط:

- در شرایط بیهوشی جراحی و متعاقباً بدون کاهش سطح هوشیاری، یوتانزی حیوان

- نیاز به برداشت حجم زیاد خون و زنده نگاه داشتن حیوان؟ - سایر روشهای خونگیری. مثلاً:

• اخذ نمونه خون از خرگوش آزمایشگاهی (۱۳۹۴). سیاوش احمدی نوربخش و عصمت میراب زاده اردکانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. سال ۳۳، شماره ۳۳۸، صفحات ۹۱۷-۹۲۳.

خونگیری از قلب



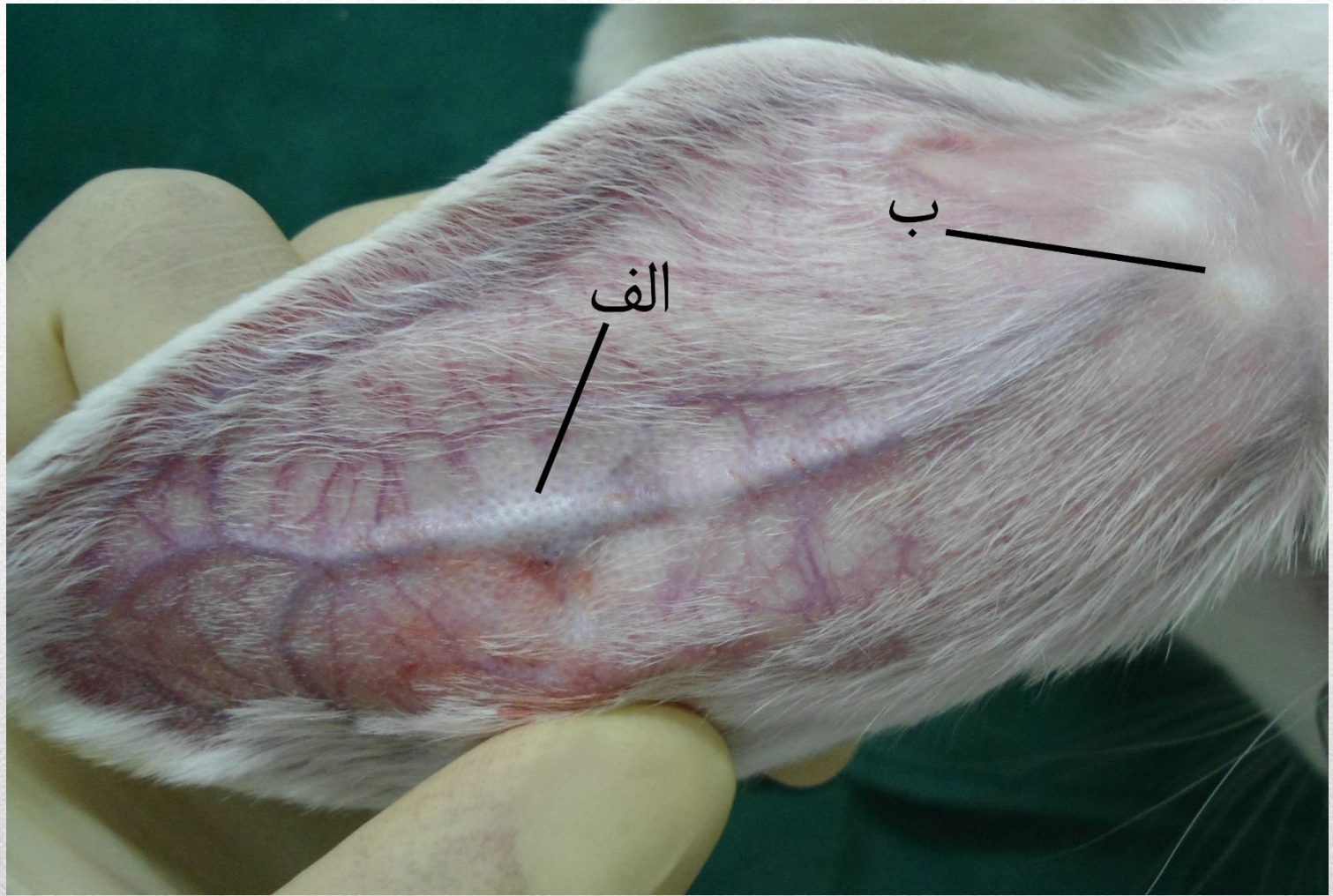
وسایل مورد نیاز



تهیه سرنگ و سرسوزن پروانه‌ای



رگهای گوش



بی حسی گوش



خونگیری

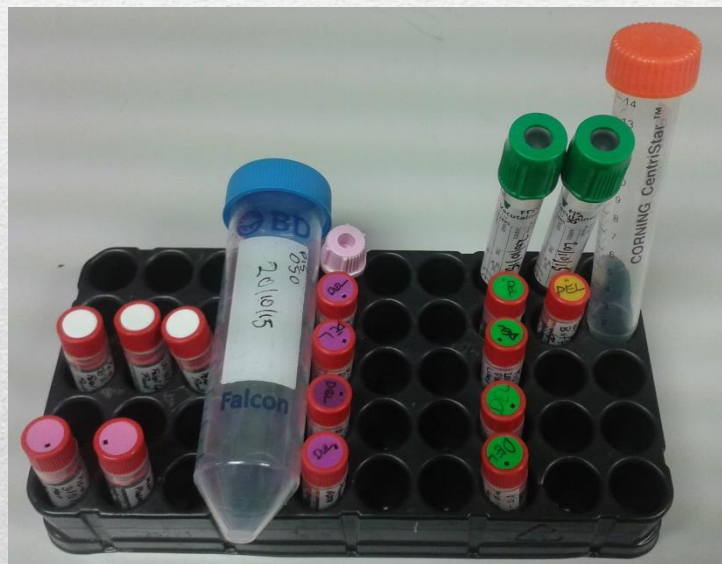


خونبندی

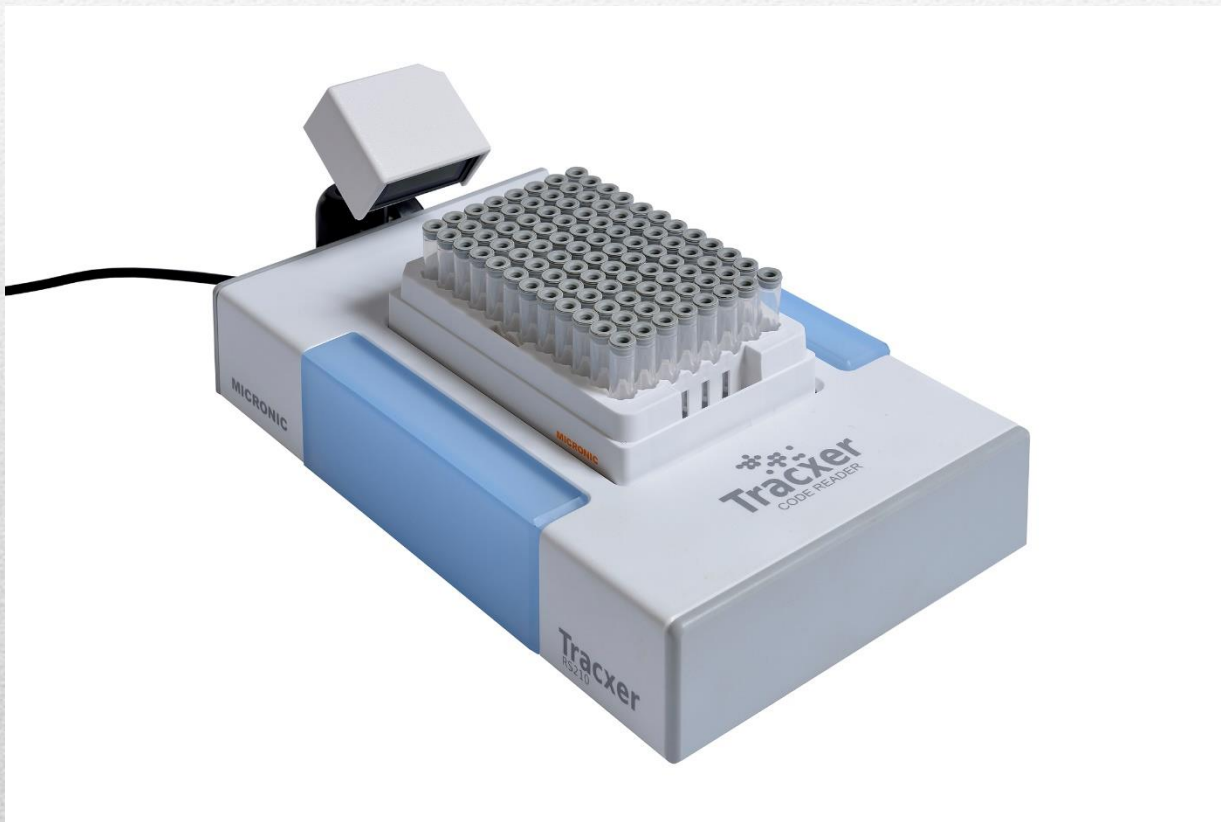
- فقط در شرایط بیهوشی و بی‌دردی!
- میزان خون قابل برداشت:
 - خونگیری از قلب:
 - معمولاً نیمی از کل حجم خون در گردش
 - قطع سر با قیچی یا گیوتین:
 - ۹ میلی‌لیتر خون از رت ۳۰۰ گرمی
 - ۰/۶ میلی‌لیتر از موش ۲۰ گرمی
 - ۱۱۵ میلی‌لیتر از خرگوش ۳/۵ کیلوگرمی
- خون بیشتر؟
 - کاتتریزاسیون جراحی کاروتید یا آئورت

خونگیری کامل (exsanguination)

- استفاده از ترکیبات مختلف رنگ در و سرپوش ویال‌ها (cryovials)



علامتگذاری نمونه‌ها و مدیریت آنها



- Websites:
 - www.free-barcode-generator.net
 - <http://labcollector.com/>

- Software:
 - eCAT Sample Management
 - FluidX
 - Freezer Pro
 - ItemTracker
 -

نرم افزارهای مدیریت نمونه‌ها

- انواع روشهای نمونه برداری
- طراحی صحیح روش نمونه برداری با توجه به نیازهای پژوهش
- رعایت الزامات اخلاقی در طراحی روش نمونه برداری

- اصول خونگیری در پژوهش
- حجم، محل، سرعت، جایگزینی حجم خون برداشت شده،

- علایم خونگیری بیش از حد

- روشهای خونگیری دارای حساسیت اخلاقی

- مدیریت نمونه ها

جمع بندی

- نمونه برداری صحیح یکی از حیاتی ترین مراحل یک پژوهش است.

نهایتاً

