

اجرای برنامه کشوری پیشگیری و کنترل بیماری فنیل کتونوری از سال ۱۳۸۶، لزوم تدوین دستورالعملی جامع جهت کلیه عوامل اجرایی و مدیریتی را مطرح نمود که این مهم توسط استادان گرانقدر سرکار خانم دکتر رضی و جناب آقای دکتر کازرونی در همان سال انجام گردید. وبرایش دوم این دستورالعمل در سال ۱۳۸۹ با تاکید بیشتر بر روی مدیریت نمونه توسط همکار گرامی سرکار خانم دکتر سجادیان صورت گرفت.

دستورالعمل پیش رو ویرایش سوم این مجموعه می باشد که با تکیه بر الزامات استاندارد سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاهها و با تاکید بیشتر بر فرایندهای مدیریت کارکنان ، مدیریت تجهیزات ، کنترل فرایند (پیش از انجام آزمایش ، انجام آزمایش وپس ازانجام آزمایش) ،مستندسازی و مدیریت عدم انطباق در سال ۱۳۹۴ تدوین گردیده است که امید است موجب ارتقا کیفیت عملکرد آزمایشگاههای فعال در زمینه پیشگیری و کنترل بیماری فنیل کتونوری گردد.

دکتر خداوردیان بهمن ۱۳۹۴

مقدمه:

فنیل کتونوری:

فنیل آلانین یک اسید آمینه ضروری است. چنانچه از فنیل آلانین مواد غذایی در بدن برای ساخت پروتئین استفاده نشود، این ماده بطور طبیعی تجزیه می گردد. کمبود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز یا کوفاکتور آن یعنی تترا هیدروبیوپتیرین موجب تجمع فنیل آلانین در مایعات بدن می شود. و فرم های مختلف بالینی و بیوشیمیایی افزایش فنیل آلانین در بدن وجود دارد.

فنیل کتونوری (PKU) نوع کلاسیک:

این نوع بیماری بدلیل کمبود یا فقدان آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ایجاد می شود. فنیل آلانین اضافی به فنیل پیرویک اسید و فنیل اتیلین آمین تبدیل می شود. این متابولیت ها و سایر متابولیت های بعدی همراه با فنیل آلانین اضافی متابولیسم طبیعی را مختل نموده و موجب صدمه مغزی می گردند. کودک مبتلا در ابتدای تولد طبیعی است و عقب ماندگی ذهنی بتدریج پیشرفت می کند و طی چند ماه آشکار می شود. کودک در صورتی که تحت درمان قرار نگیرد، به ازماء هر ماه ۴ نمره از IQ او کاسته خواهد شد و تا پایان سال اول ۵۰ نمره از IQ را از دست خواهد داد. عقب ماندگی مغزی در این بیماری شدید است و کودک مبتلا پرفعالیتی همراه با حرکات بی هدف پیدا می کند. اغلب بیماران مبتلا، نیاز به مراقبت مخصوص دارند. بوی مخصوص و نامطبوع این کودکان مربوط به متابولیت اسیدلاکتیک است. در معاینه عصبی، علائم یکنواختی را نمی توان یافت. اغلب بیماران هیپرتونیک هستند و ۱/۴ این بیماران تشنج نیز دارند. در کشورهایی که غربالگری نوزادان در حال انجام است و کودکان مبتلا به موقع شناسایی و درمان می شوند بندرت می توان تظاهرات این بیماری را یافت.

این بیماری در بدو تولد با اندازه گیری فنیل آلانین خون قابل تشخیص است. کافی است چند قطره خون مویرگی بر روی کاغذ فیلتر گرفته شود و به آزمایشگاه منتخب ارسال، تا آزمایش لازم انجام گردد. توصیه می شود خون نوزاد بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تولد وی و بعد از شروع تغذیه با شیر گرفته شود. این موجب می شود تا نتایج منفی کاذب کاهش یابد. در صورتی که این تست مقدماتی افزایش فنیل آلانین را نشان دهد، فنیل آلانین و تیروزین سرم (با روش HPLC) باید اندازه گیری شود. در صورتی که فنیل آلانین خون بیش از ۲۰ mg/dl و تیروزین خون طبیعی باشد و همچنین متابولیت های فنیل آلانین در ادرار افزایش یافته باشد و اختلال مربوط به تراهدروبیوپتیرین (کوفاکتور فنیل آلانین هیدروکسیلاز) رد شود، تشخیص PKU کلاسیک تأیید می شود.

اقدامات درمانی این بیماری متمرکز بر کاهش فنیل آلانین و متابولیت های آن در خون است و هدف آن ممانعت یا کاهش صدمه مغزی است. فنیل آلانین رژیم این بیماران باید محدود شود. این رژیم باید تحت نظر یک متخصص تغذیه تنظیم گردد و با آزمایشات مکرر خون از سطح مناسب فنیل آلانین خون اطمینان حاصل شود. سطح فنیل آلانین کنترل شده در بیماران بین ۲ mg/dl تا ۶ mg/dl در کودکان زیر ۱۲ سال و ۲ تا ۱۰ mg/dl برای کودکان بزرگتر از ۱۲ سال است.

گرچه بعد از ۶ سال از عمر کودک شدت کنترل رژیم غذایی کاهش می یابد لیکن، رژیم مخصوص غذایی تا پایان عمر ادامه یابد.

PKU غیر کلاسیک یا بدخیم (کمبود کوفاکتور BH4):

در حداقل ۲٪ کودکانی که افزایش فنیل آلانین خون دارند نقص در آنزیم هایی است که ایجاد یا تجدید BH4 را موجب می شوند. در این کودکان حتی در صورتی که فنیل آلانین خون کنترل شود پیشرفت صدمه مغزی ادامه می یابد. BH4 کوفاکتور آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز، تیروزین و تریپتوفان است و هیدروکسیلازهای تیروزین و تریپتوفان برای ساخت نوروترانسمیترهای دوپامین و سروتونین ضروری است. چهار اختلال آنزیمی که منجر به کمبود این کوفاکتور می شوند شناخته شده اند. بیش از ۵۰٪ اختلال مربوط به کمبود آنزیم ۶- پیروویل تراهدروپتیرین سنتاز (PTS-۶) و کمبود DHPR است.

از نقطه نظر بالینی علائم این بیماری شبیه بیماران فنیل کتونوری کلاسیک است ولی علی رغم رژیم درمانی مناسب، علائم شان بعد از ۳ ماهگی ادامه می یابد (به استثنای کمبود یا فقدان آنزیم کاربونیلامین دهیدراتاز که علائم بالینی ندارد و این بدلیل آن است که دهیدراتاسیون میتواند بطور غیر آنزیماتیک و به آهستگی انجام شود و BH2 ایجاد گردد). یکی از راه های تشخیص این بیماری تجویز BH4 است که به loading test معروف است. در این روش BH4 خوراکی داده می شود یا داخل ورید تجویز می شود و در بیماران مبتلا به این کمبود، فنیل آلانین خون طی ۴ تا

۶ ساعت طبیعی می‌گردد. تست در حالی انجام می‌شود که رژیم غذایی کودک حاوی فنیل آلانین باشد. برخی بیماران مبتلا به نقص آنزیمی دی‌هیدروپتیدین ردوکتاز (DHPR) به این تست جواب نمی‌دهند. این گروه اخیر را می‌توان از طریق بررسی آنزیمی تشخیص داد. این نقص همچنین می‌تواند از طریق مطالعه ژن مربوطه نیز شناسایی شود. درمان به روش‌های مختلف انجام می‌شود و اثرات طولانی مدت درمان همچنان نامعلوم است، از جمله روش‌های درمانی در این بیماری رژیم محدود در فنیل آلانین و همچنین تجویز پیش‌سازهای نوروترانسمیترها (۵-hydroxytryptophan, L-dopa) است. روش دیگر درمان، رژیم محدود در فنیل آلانین و تجویز خوراکی BH₄ است. دوز کم روزانه این ماده، فنیل آلانین خون را کاهش می‌دهد و در صورتی که با دوز بالا (۲۰-۴۰ mg/kg/۳h) تجویز شود این ماده از سد خونی مغزی نیز عبور نموده و پیشرفت صدمات مغزی را مانع می‌گردد.

فنیل آلانینمی گذرا:

افزایش فنیل آلانین خون در تیروزینمی گذرا نوزادان رخ می‌دهد. وقتی توانایی نوزادان برای اکسید کردن تیروزین تکامل یابد، سطح فنیل آلانین خون طبیعی خواهد شد. فنیل آلانین ترانس آمیناز نیز اگر وجود نداشته باشد یا به حد کافی تکامل نیافته باشد، می‌تواند این مشکل را در صورتی که نوزاد محتوای پروتئینی شیرش بالا باشد، ایجاد نماید. این نوزادان حتی وقتی سطح فنیل آلانین خونشان به ۳۰ mg/dl می‌رسد فنیل کتونوری ندارند و مبتلا به فنیل آلانینمی گذرا هستند و اگر شیر آنها محتوای پروتئینی شیر انسان را داشته باشد وضعیت طبیعی پیدا می‌کنند.*

نمونه گیری:

نمونه گیری صحیح از نوزاد با شرایط و در زمان مناسب شرط اول غربالگری است. استفاده از کاغذ فیلتر مورد تایید برنامه کشوری واتمن ۹۰۳ و عدم بکارگیری فیلترهای دیگر نیز از ضروریات نمونه گیری صحیح می‌باشد. رعایت موارد مندرج در بخش نمونه‌گیری و خونگیری در فاصله ۳ تا ۵ روز بعد از تولد و بر اساس روش استاندارد که توسط کمیته ملی استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی *CLSI ارائه شده است، انجام میشود.

آموزش حضوری کارکنان نمونه‌گیری یکبار در سال ضروری می‌باشد. (آموزش نیروی انسانی جدید قبل از شروع بکار انجام گردد)

وسایل مورد نیاز:

کاغذ فیلتر واتمن ۹۰۳، لانست، پنبه، الکل ایزوپروپانول ۷۰٪ یا پد الکلی، گاز، حوله برای گرم کردن پا، راک برای خشک شدن فیلترها، فرم‌های مربوطه

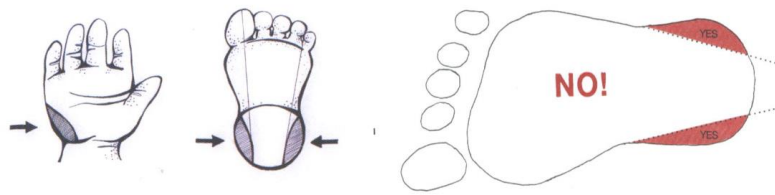
۱- پیر کردن فرم نمونه‌گیری:

فرم مخصوص نمونه‌گیری باید ابتدا و قبل از نمونه‌گیری بطور کامل و با جزئیات درج شده تکمیل شود. مشخصات لازم دقیق و خوانا روی فرم مخصوص نمونه‌گیری با خودکار و روی سطح صاف تکمیل شود. قبل از شروع نمونه‌گیری شماره‌های پرسشنامه و کارت خونی را تطبیق داده و از یکسان بودن آنها مطمئن شوید. اطمینان از یکسان بودن شماره‌ها بسیار مهم است.

۲- آماده کردن نوزاد:

نمونه‌گیری می‌تواند در آغوش مادر انجام شود. برای جلوگیری از آلودگی و سرماخوردگی نوزاد فقط پای او را لخت نمایند. محل خونگیری پاشنه پای نوزاد است (شکل ۱) محل خونگیری می‌بایست از سطح قلب پائین تر باشد. در صورت داشتن اسکار، بریدگی، تورم و راش از نمونه‌گیری از پاشنه پا خودداری گردد. پاشنه پا را با یک گاز یا حوله ولرم گرم کنید تا جریان خون در محل افزایش یابد (حرارت ۴۱-۴۰ درجه سانتیگراد باعث افزایش جریان خون در موضع می‌شود). دست‌هایتان را خوب شسته و دستکش دست کنید. محل لانست در پاشنه پا و اطراف آن را با الکل ایزوپروپانول ۷۰٪ و یا پد الکلی به خوبی پاک نموده و صبر کنید تا در جریان هوا خشک شود الکل باقی مانده روی پوست نمونه را تحت تاثیر قرار داده و بر نتایج آزمایش اثر می‌گذارد. الکل باعث همولیز گلبول‌های قرمز می‌شود و در اطراف نمونه بر روی کاغذ فیلتر حلقه سرمی ظاهر می‌گردد.

* CLSI Clinical and Laboratory standards Institute



شکل ۱- محل لانتست زدن

۳- نمونه گیری از نوزاد:

پس از پوشیدن دستکش و ضد عفونی کردن موضع، با استفاده از لانتست مورد تایید^۱ ضربه یکنواخت و آرامی به پاشنه پا (شکل ۱) وارد نمائید تا خون به راحتی جاری شود. در نوزادان نارس برای جلوگیری از آسیب به استخوان، تاندون و عصب، عمق پانچ نباید بیشتر از ۲ میلی متر باشد. به هر دلیلی که امکان خونگیری از پاشنه پا وجود نداشته باشد، از نرمه کناری دست خون گیری انجام شود. حاشیه کناری پاشنه پا و نرمه دست مطمئن ترین محل می باشد (شکل ۱). در بالغین از سطح داخلی انگشت دست (بند آخر انگشتان میانه و یا چهارم) و بچه های بزرگتر از یکسال معمولاً از نرمه دست استفاده می گردد. به ناحیه مرکزی پاشنه پا در نوزادان ضربه نزدیک زدن زیرا استخوان خیلی به پوست نزدیک است.

قطره اول خون را با گاز پاک کرده (چون حاوی مایعات نسجی است و باعث رقت خون می گردد) ، سپس فشارهای متناوب و مختصری به پاشنه پا وارد کنید تا قطره بزرگی شکل گیرد. کارت نمونه گیری را به قطره خون نزدیک کرده تا خود بخود جذب مرکز دایره فیلتر شده و پشت و روی آن را به صورت یکنواخت بپوشاند و آن را اشیاع کند. و با یک تکنیک صحیح می توان ۵دایره نمونه خون روی کاغذ فیلتر به روش ذکر شده تهیه کرد. در صورت نیاز به نمونه گیری مجدد از محل دیگر، استفاده از ست جدید نمونه گیری (شامل: لانتست، پنبه، الکل و گاز) الزامی است.

از کارت واتمن ۹۰۳ دارای نام تولید کننده، شماره ساخت و تاریخ انقضاء و مورد تایید وزارت بهداشت و درمان استفاده گردد. جمع آوری نمونه خون وریدی (بوسیله سرنگ) و انتقال قطره خون بر روی کاغذ فیلتر برای غربالگری نوزادان نباید استفاده گردد ولی روش مذکور در انجام آزمایش کنترل درمان بیماران PKU قابل استفاده است.

* حداکثر طول سوزن لانتست مورد تایید ۲ میلی متر می باشد.

۴- مراقبت از زخم:

بعد از نمونه گیری، پا را بالای سطح بدن نگه دارید. به مدت ۵ دقیقه گاز را روی محل خونگیری قرار داده و تا بند آوردن خون موضع با دست فشار دهید. سپس می توان چسب مخصوص ضد حساسیت بر روی محل نمونه گیری قرار دهید. لانتست و تمام وسایل استفاده شده باید به شکل بهداشتی معدوم شوند

پس مانده های تیز در safety box (ظرف ایمن) جمع اوری شده و پس از آلودگی زدایی به طریقه بهداشتی دفع گردد.

نکات مهم در نمونه گیری:

۱- جهت نمونه گیری نیاز به ناشتا بودن نوزاد نمی باشد. و می بایست قبل از نمونه گیری حداقل به مدت ۷۲ ساعت تغذیه مناسبی با شیر داشته باشد.

۲- مشخصات نوزاد روی کاغذ فیلتر نمونه گیری صرفاً توسط خودکار نوشته شود استفاده از روان نویس، خودنویس و مداد و ممنوع است.

۳- کاغذ فیلتر نمونه گیری به هیچ عنوان آغشته به مواد خارجی نگردد.

۴- از تماس با سطوح دواپر کاغذ فیلتر جدا خودداری شود.

ویژگی های نمونه مناسب:

- ۱- شکل نمونه باید بصورت دایره باشد.
- ۲- قطر لکه خون بیش از ۵ میلی متر باشد.
- ۳- لکه خون از دو طرف همسان دیده شود.
- ۴- دو لکه روی هم نباشد.
- ۵- در یک دایره بیش از یک لکه نباشد.
- ۶- کاغذ فیلتر نمونه گیری آغشته به مواد خارجی نباشد.
- ۷- لکه های خون بدون اثر انگشت باشند.

شرایط نگهداری و نحوه ارسال نمونه از مراکز نمونه گیری:

- ۱- بعد از تهیه نمونه، کارت نمونه گیری حاوی خون نوزاد را به صورت افقی روی راک مسطح مخصوص قرار دهید.
 - ۲- زمان لازم جهت خشک شدن کامل لکه های خون بر روی کاغذ فیلتر در حرارت اتاق (۲۵-۱۸ درجه سانتی گراد) بمدت ۳ ساعت می باشد.
 - ۳- در زمان خشک شدن از قرار دادن کارت های خونی در جریان هوای آلوده به دود و گرد و غبار جداً خودداری شود
 - ۴- از گذاشتن کارت های خونی در معرض حرارت و تابش مستقیم نور خورشید اکیداً پرهیز شود.
 - ۵- کارت های نمونه گیری می بایست بدون چروک و یا تاخوردگی باشند.
 - ۶- هر یک از نمونه های کاملاً خشک شده را جداگانه و به ضمیمه فرم مشخصات نوزاد در پاکت قرار دهید.
 - ۷- نگهداری و انتقال کاغذ فیلترها می بایست بدون فشار و ایجاد آسیب در آنها صورت گیرد
 - ۸- مواد شیمیایی و سایر نمونه های بیولوژیک نباید در ظرف حمل کارتهای خونی بسته بندی شوند.
 - ۹- کارت های خونی را می توان به مدت یک هفته در پاکت های مقاوم به رطوبت در درجه حرارت اتاق نگهداری نمود.
 - ۱۰- کارت های حاوی لکه های خون در پاکت های پلاستیکی زیپ دار و حاوی سیلیکاژل در صورتی که میزان رطوبت محیط کمتر از ۳۰ درصد باشد تا ۲ سال در دمای ۸-۴ درجه قابل نگهداری است و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت طولانی و بیش از ۲ سال پایدار می ماند در مناطقی با رطوبت بیشتر از ۳۰ درصد بعلت اثر نامساعد رطوبت بر میزان جذب نوری، حتماً در انتقال نمونه ها و نگهداری آنها باید رطوبت محیط توسط مواد رطوبت گیر کنترل گردد. زیرا رطوبت بر روی پایداری نمونه ها نقش تعیین کننده دارد.
- انتقال نمونه ها به آزمایشگاه غربالگری در مرکز استان، می بایست حداکثر ۲۴ ساعت بعد از نمونه گیری انجام گیرد. در صورت عدم امکان ارسال سریع نمونه کاغذ فیلتر، آن را در یخچال نگهداری کنید و در اولین فرصت ارسال شود.

شکل ۲



آزمایشگاه غربالگری

نمونه های ارسال شده از مراکز نمونه گیری در صورتی که فاقد ویژگی های نمونه مناسب باشد آزمایشگاه باید نمونه دیگری را درخواست کند.

مشخصات فضای فیزیکی

آزمایشگاه باید فضایی به مساحت حداقل ۳۰ مترمربع داشته باشد (بجز فضای نمونه گیری).

کارکنان

استفاده از کارکنان آموزش دیده و ثابت در آزمایشگاه غربالگری، یکی از مهمترین ارکان تضمین کیفیت است. پرسنل فعال در این آزمایشگاه باید دارای تحصیلات مطابق با دستورالعمل کارکنان مندرج در استانداردهای مرجع سلامت بوده (حداقل کاردان علوم آزمایشگاهی) و پس از طی دوره های آموزشی، در آزمایشگاه غربالگری شروع بکار نمایند.

کارکنان قبل از شروع به فعالیت در آزمایشگاه غربالگری باید سرفصل زیر را آموزش ببینند:

آشنایی با اصول غربالگری نوزادان، آشنایی با مبانی تضمین کیفیت و اصول مستندسازی، آشنایی با تجهیزات مرتبط و نحوه کنترل ونگه داری آنها، آشنایی با اصول آزمایش و کنترل کیفی و خطاهای آن و نیز انجام حداقل ۲۰۰ آزمایش غربالگری جهت آشنایی کارکنان با فرایند انجام آزمایش و منابع ایجاد خطا ضروری می باشد.

لازم است بر اساس نیاز سنجی آموزشی، برنامه های آموزشی دوره ای ضمن خدمت هم برگزار گردد و سوابق آموزشی در پرونده کارکنان نگه داری گردد.

در صورت استفاده از پرسنل غیر ثابت، مسئول فنی باید هماهنگی های لازم جهت آموزش پرسنل فراهم کرده و صلاحیت آنها را قبل از شروع به کار تایید نماید.

تجهیزات

باید در نظر داشت تجهیزات ذکر شده مطابق با دستورالعمل فعلی غربالگری نوزادان می باشد. در صورت ورود تکنولوژی و یا کیت جدید، تهیه سایر ملزومات مطابق با دستورالعمل انجام آزمایش ضروری می باشد.

تجهیزات ضروری مورد استفاده در آزمایشگاه غربالگری نوزادان به شرح زیر می باشد:

دستگاه قرائت کننده الایزا: حتماً باید از نوع Plate Reader خریداری گردد. دستگاه می بایست حداقل روی طول موجهای ۴۰۵، ۶۳۰ نانومتر قابل تنظیم بوده و به سیستم مخلوط کننده (Mixing) مجهز باشد.

شیکر مخصوص الایزا

شیکر می بایست توانایی ایجاد لرزش ۶۰ دور در دقیقه را داشته باشد.

میکرو پیت / سمپلر: سمپلر ۸ شاخه (۳۰۰-۳۰ میکرولیتر)، در صورت تمایل آزمایشگاه ها می توانند بجای سمپلر ۸ شاخه از میکروپیت های اتوماتیک یا نیمه اتوماتیک (Repetitive Pipettes) مناسب استفاده نمایند.

ترجیحاً پانچر اتوماتیک (حداقل نیمه اتوماتیک)

سایر تجهیزات شامل:

دماسنج: دما سنج مورد استفاده باید دارای قدرت تفکیک ۱-۰ درجه باشد.

یخچال: قابلیت حفظ دمای ۸-۲ را داشته باشد. برفک ایجاد نکند و در طبقات مختلف از دمای یکسان برخوردار باشد.

فریزر ۲۰- درجه، سیستم تخلیص آب، کنداکومتر و بن ماری (در صورت نیاز با توجه به نوع کیت مورد استفاده)

*آزمایشگاه می تواند آب مورد نیاز خود را خریداری نماید. در اینصورت نیازی به سیستم تخلیص آب نیست.

سایر مواد و وسایل مصرفی مورد نیاز شامل دستکش، نوک سمپلر، آب نوع ۲، کیت مورد تایید برنامه، محلول سفید کننده خانگی با رقت

۱/۱۰ (دارای کلر فعال ۵ درصد باشد)، کاغذ فیلتر و موارد مورد نیاز برای انجام آزمون غربالگری مطابق با دستورالعمل کیت

روشهای آزمایشگاهی اندازه گیری فنیل آلانین

روش های غربالگری :

۱- روش اسپکتروفتومتری :

روش اسپکتروفتومتری در بسیاری از مطالعات بعنوان روشی مناسب و قابل دستیابی برای غربالگری معرفی شده است. در کشورهای مختلف روش مورد استفاده برای غربالگری نوزادان برای بیماری PKU متفاوت می باشد. بعنوان مثال در آمریکا شایعترین روشهای مورد استفاده فلوریمتری و Tandem mass spectrometry می باشد

در ایران با در نظر گرفتن امکانات کشور، روش اسپکتروفتومتری به عنوان روش غربالگری در کشور انتخاب شده است.

در این روش فنیل آلانین از لکه خون روی کاغذفیلتر استخراج شده و تحت تاثیر آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز قرار می گیرد. واکنش باعث احیای NAD موجود در محیط به NADH می گردد که خود این محصول باعث احیای اندیکاتور شده و رنگ صورتی مایل به قرمز ایجاد می کند. رنگ ایجاد شده که با غلظت فنیل آلانین رابطه مستقیم دارد، در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش شده و نتیجه در مقایسه با منحنی حاصله از کالیبراتورها، محاسبه می شود. در روشهای اسپکتروفتومتری، فنیل آلانین تحت تاثیر آنزیم مشخص به محصولی تبدیل می گردد که این محصول قابل سنجش است.

۲- روش فلوریمتری :

فنیل آلانین در حضور L-lecyle-L-alanine با نین هیدرین تبدیل به یک ترکیب فلورسنت می شود که میزان آن با غلظت فنیل آلانین رابطه مستقیم دارد. رازین قلیایی تارتارات مس برای پایدار کردن محصول فلورسنت بکار می رود. این روش یکی از متداولترین روشهای غربالگری در ایالات متحده است.

۳- Tandem mass spectrometry

در این روش دو یا بیشتر mass analyzer پشت سر هم قرار می گیرند. ابتدا ترکیب مورد نظر یونیزه شده و از این طریق از سایر مواد جدا می شود. در مرحله بعد در برخورد با یک گاز خنثی، به حالت کلونید درآمده و توسط اسپکترومتر بعدی خوانش می شود. این روش از حساسیت، اختصاصیت، صحت و دقت بالایی برخوردار بوده، موارد مثبت و منفی کاذب کمی دارد. از آنجاییکه به فن آوری و تسلط فنی ویژه نیاز دارد و انجام آن هزینه بالایی نیز دارد در مواردی که امکان انتقال فن آوری و غربالگری چندین بیماری در جمعیت وسیع بطور همزمان وجود دارد مقرون به صرفه می باشد.

۴- Guthri test

تست گاتری یک روش نیمه کمی میکروبیولوژیک است که از باسیلهای اسپوردار خصوصاً *Bacillus subtilis* استفاده می نماید. باسیلهای در آگاهی که حاوی یک ماده مهارکننده رشد باکتری (مهارکننده اغلب ساختمان مولکولی مشابه با اسید آمینه مورد نظر دارد) است، تلقیح می شوند. نمونه روی آگار قرار گرفته و پلیت انکوبه می شود. بعد از مدت مشخص پلیت از نظر رشد باکتری بررسی می شود. در صورت وجود مقادیر بالایی از اسید آمینه مورد نظر، فعالیت ماده مهارکننده کاهش یافته و رشد باکتری مشاهده می گردد. سیستم طوری طراحی می شود که مقادیر غیرطبیعی اسید آمینه را شناسایی نماید.

۵- روش فتومتری (آزمایش کلرید فریک)

از کلرید فریک برای شناسایی فنیل پیروویک در ادرار استفاده می شود. ولی از آنجاییکه تا مقدار فنیل آلانین خون به ۱۵-۱۲ mg/dL نرسد، فنیل پیروویک به مقدار قابل سنجش در این روش نمی رسد، برای مقاصد غربالگری استفاده نمی شود. از این روش برای کنترل درمان بیماران، استفاده می شود.

روش های تایید تشخیصی :

فنیل آلانین مانند سایر اسیدهای آمینه به روشهای کیفی، نیمه کمی و کمی قابل اندازه گیری است. روشهای مختلف کروماتوگرافی، اسپکتروفتومتری، فلوریمتری، Guthri tandem mass spectrometry و فوتومتری (مانند کلرید فریک برای اندازه گیری فنیل پیروویک) عمده ترین روشهای اندازه گیری فنیل آلانین می باشند.

روشهای کروماتوگرافی: HPLC, Ion exchange chromatography, Thin layer chromatography و Gas liquid chromatography متداولترین روشهای کروماتوگرافیک اندازه گیری فنیل آلانین هستند. از بین ۳ روش آخر که نتایج را بصورت کمی بیان می نمایند، HPLC با توجه به حساسیت عالی، قدرت تفکیک مناسب و زمان کوتاه آنالیز بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

آزمایشگاههای غربالگری و تایید تشخیص:

۱- آزمایشگاههای غربالگری

در این آزمایشگاهها، نمونه های DBS پذیرش می شود و آزمایش به روش کالریمتری انجام می گردد
در آزمایش غربالگری، مقدار برش فنیل آلانین (Cut off) برای DBS ۴ mg/dl تعیین می گردد.
بعد از انجام آزمایش، نمونه های DBS می بایست به مدت ۳ سال در فریزر منهای ۲۰ درجه در آزمایشگاه نگهداری گردد.

۲- آزمایشگاههای تایید تشخیص

➤ اگر میزان فنیل آلانین در نمونه DBS غربالگری مساوی و یا بیشتر از ۴ میلی گرم درصد باشد تست غربالگری نوزاد مثبت می باشد و نوزاد به مراکز نمونه گیری فراخوان می گردد. نمونه DBS تایید تشخیص از نوزاد مذکور در این مراکز نمونه گیری گرفته شده و نمونه به آزمایشگاه تایید تشخیص ارسال می گردد. در آزمایشگاه تایید تشخیص آزمایش فنیل آلانین بر روی نمونه DBS با استفاده از روش HPLC انجام می گیرد. در صورتی که میزان برش (cut off) فنیل آلانین در نمونه DBS مساوی و یا بیشتر از ۳/۴ باشد نوزاد به بیمارستان منتخب معرفی می گردد.

➤ در آزمایشگاه بیمارستان منتخب، یک نمونه پلاسما برای اندازه گیری فنیل آلانین و تیروزین و یک نمونه DBS برای اندازه گیری فعالیت آنزیم DHPR و یک نمونه ادرار جهت اندازه گیری نوپترین و بیوپترین از نوزاد تهیه می گردد و به آزمایشگاه مرجع کشوری انستیتو پاستور ارسال می گردد.

*نکته:

• در نمونه تایید تشخیص DBS، بعلت اضافه شدن مرحله استخراج در انجام آزمایش، میزان برش (cutoff) فنیل آلانین نسبت به پلاسما کاهش یافته است و میزان آن در نمونه DBS ۳/۴ mg/dl تعیین گردیده است

• جهت تهیه نمونه پلاسما باید خون در درلوله حاوی ضد انعقاد هپارین جمع آوری و جداسازی پلاسما از خون تام باید حداکثر در مدت یک ساعت انجام گردد. در صورتی که انجام آزمایش تا ۲۴ ساعت از زمان نمونه گیری مقدور نباشد نمونه به مدت یک هفته در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد و ۲ ماه در منهای ۷۰ درجه پایدار است. جهت نمونه گیری وریدی، می بایست شیر خوران حداقل به مدت ۳ ساعت و کودکان و بزرگسالان به مدت ۱۲ ساعت ناشتا باشند.

مقدار برش فنیل آلانین (Cut off) برای پلاسما، ۴ mg/dl تعیین می گردد.

نحوه گزارش دهی

نتایج آزمایشات تایید تشخیص می بایست به واحدهای اندازه گیری میلی گرم در دسی لیتر و میکرومول گزارش گردد.

نکته:

با توجه به اینکه واحد وزن در سیستم SI (System International) مول است برای تبدیل میلی گرم در دسی لیتر به میکرومول کافی است از فرمول زیر استفاده گردد.

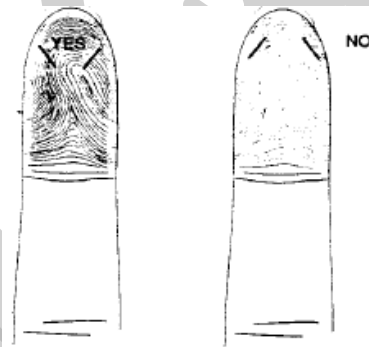
فاکتور (۶۰/۵۴) * مقدار mg/dl = مقدار (میکرومول در لیتر) در واحد های SI

۳- آزمایشگاههای کنترل فنیل آلانین در طول درمان

اندازه گیری دوره ای سطح خونی فنیل آلانین پس از تشخیص اولیه و شروع رژیم غذایی از الزامات پیگیری درمان موفق است. فواصل اندازه گیری در سنین مختلف در بخش استانداردهای درمان ذکر شده است.

برای پیگیری درمان از روش اسپکتروفتومتری استفاده می شود

نمونه مورد استفاده در این مرحله نمونه لکه خون است که بسته به سن بیمار از پاشنه پا، کنار دست یا نوک انگشت بدست می آید، و بر روی کاغذ فیلتر مطابق به روش ذکر شده در این دستورالعمل در آزمایشگاه بیمارستان منتخب تهیه می گردد و در صورت عدم فعالیت آزمایشگاه بیمارستان منتخب، نمونه ها به آزمایشگاه غربالگری نوزادان ارسال می گردد. در صورتیکه سن بیمار کمتر از یکسال باشد، نمونه از پاشنه پا یا نرمة کناری دست (شکل ۱) و در سنین بالاتر از سطح داخلی انگشت (بند آخر انگشتان میانه و چهارم) مطابق (شکل ۳) گرفته می شود. از سطح جانبی نوک انگشتان و همچنین سایر انگشتان نباید نمونه گیری صورت گیرد.

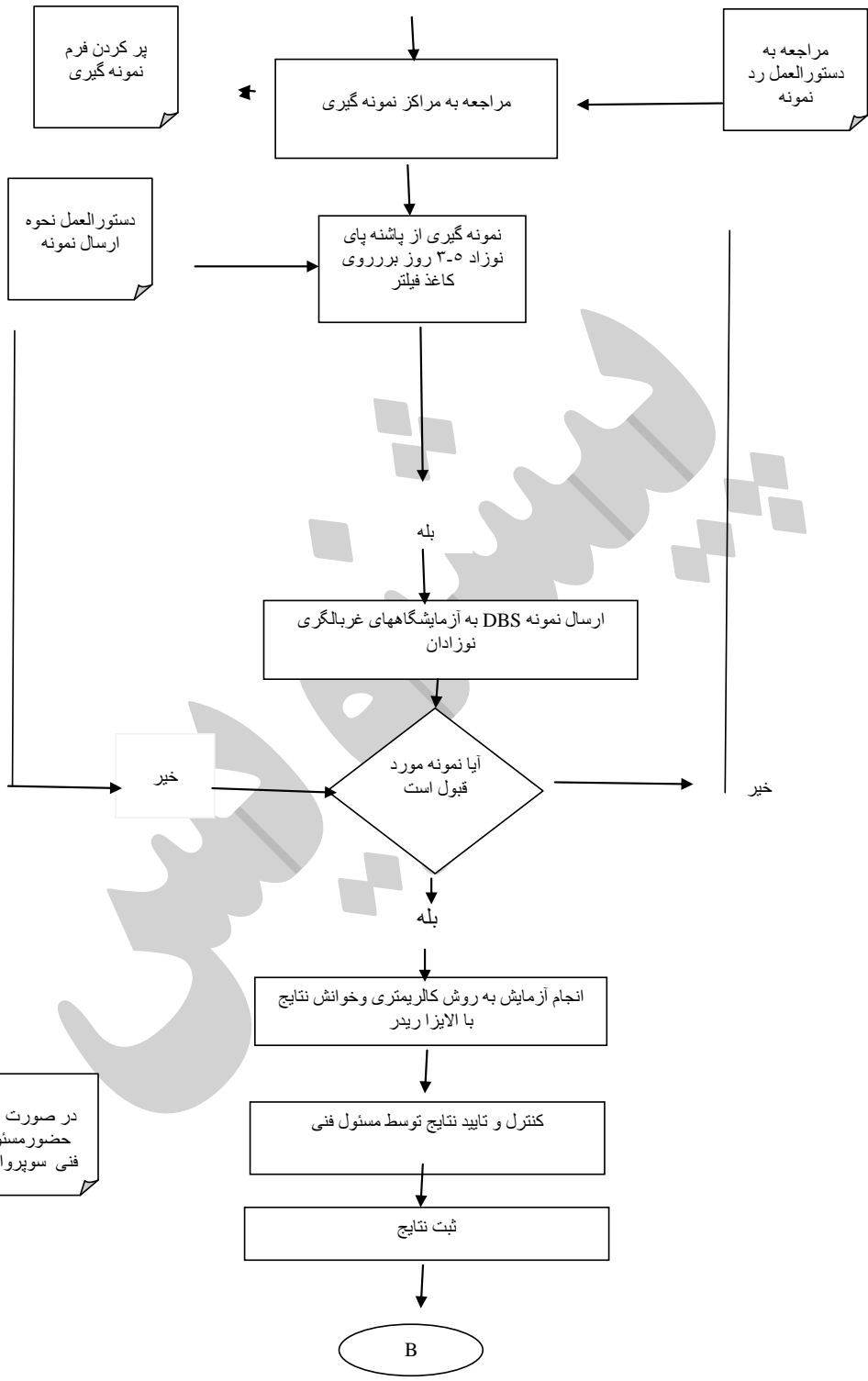


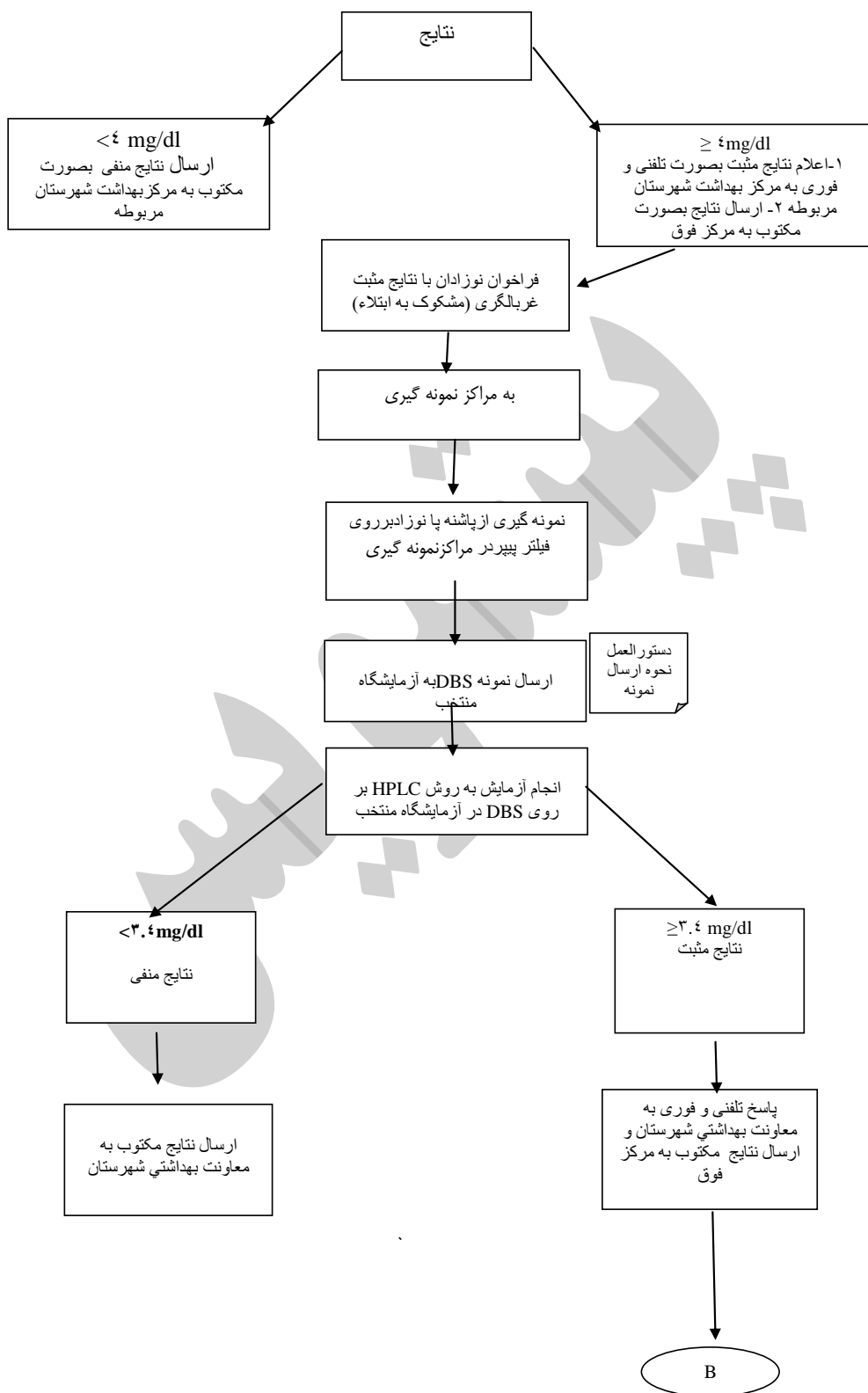
شکل ۳

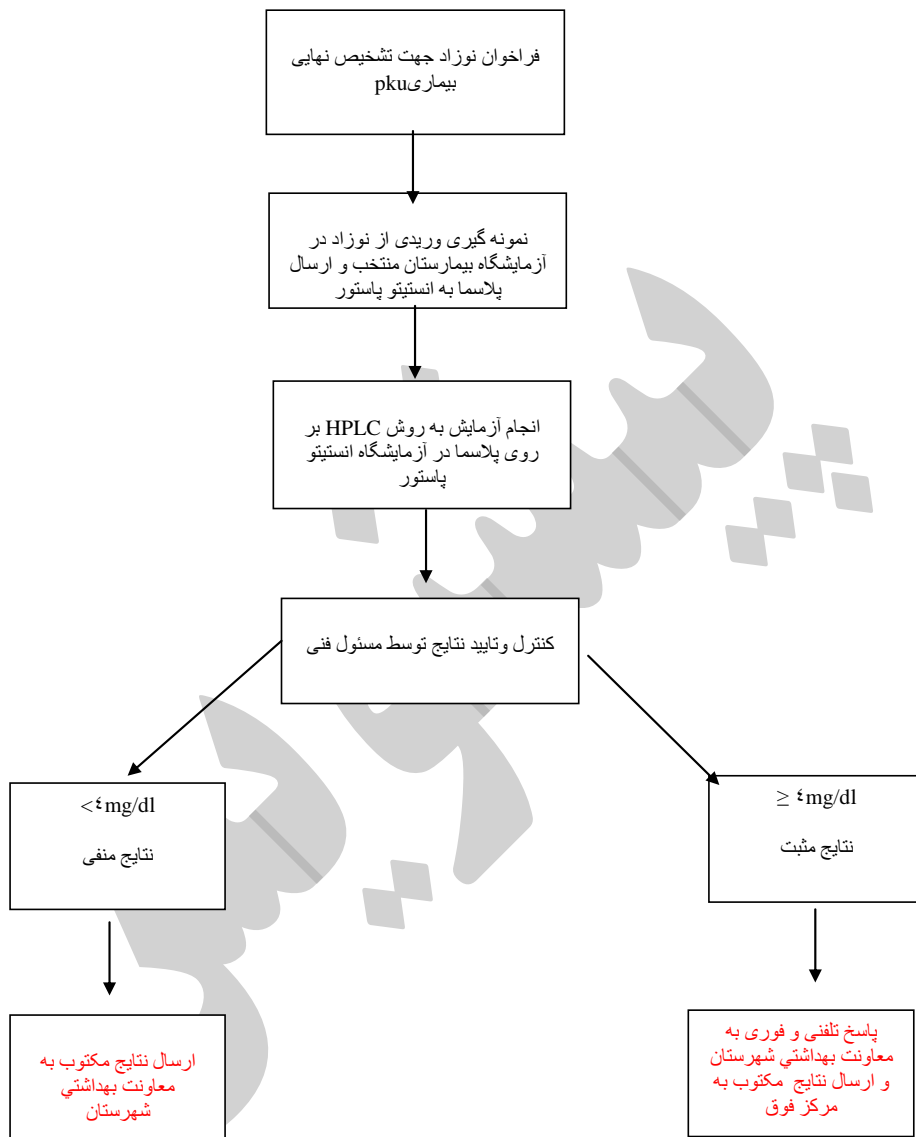
روش کلی نمونه گیری مشابه با نمونه گیری از پاشنه پا بوده و تمامی مراحل مندرج در بخش نمونه گیری باید انجام شود.

در صورتی که آزمایشگاه بیمارستان منتخب قادر به انجام آزمایش در طی ۲۴ ساعت نباشد بیمار جهت انجام آزمایشات کنترل درمان به مرکز نمونه گیری محل سکونت خود مراجعه و نمونه گیری انجام می گیرد. این امر با همکاری مراکز نمونه گیری باید بصورتی انجام گیرد که جواب آزمایش در روز مراجعه بیمار به بیمارستان منتخب آماده باشد.

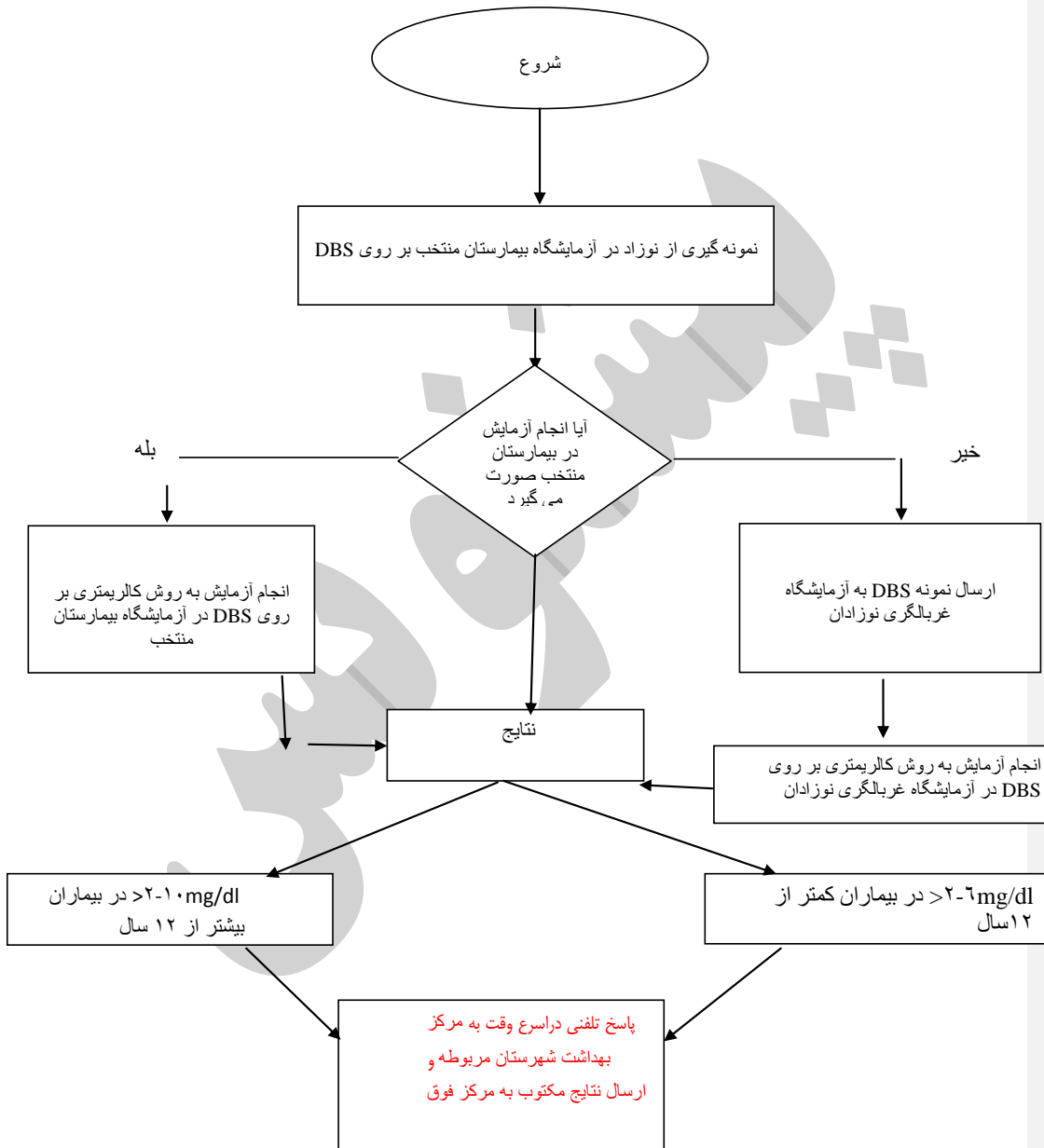
روش اجرایی فرآیند غربالگری نوزادان، تایید تشخیص و کنترل درمان از نظر بیماری فنیل کتون اوری ویژه آزمایشگاه (نمودار گردشی)







کنترل درمان



ساختار تشکیلاتی دستگاههای کلیدی:

دستگاههای کلیدی و مرتبط با تشخیص آزمایشگاهی pku به شرح زیر میباشند:

اداره ژنتیک

آزمایشگاه مرجع سلامت

معاونت های درمان و بهداشت

آزمایشگاههای غربالگری نوزادان

آزمایشگاه تایید تشخیص (لیست این آزمایشگاهها سالانه اعلام می گردد.)

آزمایشگاه انستیتو پاستور

تشکیلات و وظایف

اداره ژنتیک

- ۱- تشکیل کمیته علمی متشکل از اعضای موثر هیئت علمی بالینی ، آزمایشگاهی، ژنتیک و صاحب نظران حوزه های مرتبط
- ۲- پیگیری تهیه امکانات لازم جهت اجرای برنامه
- ۳- جلب مشارکت و هماهنگی با سازمان و بخش های ذی ربط جهت تامین و تدارک مستمر امکانات لازم برنامه
- ۴- پی گیری قوانین و مصوبات لازم برای اجرای هماهنگ برنامه در کشور
- ۵- مشارکت در برنامه های آموزشی، توجیهی و تهیه ، تدوین و انتشار بسته های آموزشی مورد نیاز برای گروههای هدف برنامه
- ۶- پیش بینی و تدارک بودجه مناسب برای اجرای برنامه
- ۷- مشارکت در تدوین و اجرای دستورالعمل pku، بازنگری دوره ای و ارتقای آن با همکاری آزمایشگاه مرجع سلامت

آزمایشگاه مرجع سلامت

- ۱- هماهنگی و مشارکت در ارتقاء توانمندی کارکنان فنی ، ممیزین بهداشتی و نظارت بر نحوه انجام وظایف کارشناسان بر امور آزمایشگاهها
- ۲- پایش عملکرد آزمایشگاههای غربالگری و تایید تشخیص و کنترل درمان و ارائه گزارش به معاونت بهداشتی
- ۳- مشارکت در تدوین و بازنگری دستورالعمل تشخیص آزمایشگاهی و نحوه اجرای اصول تضمین کیفیت و ابلاغ آنها به آزمایشگاههای غربالگری، تایید تشخیص و کنترل درمان با هماهنگی با اداره ژنتیک
- ۴- ارزیابی کیفیت وسایل تشخیص آزمایشگاهی بر اساس پروتکل های استاندارد
- ۵- تدوین چک لیست های پایش و نظارت و بازنگری آنها در بخش های مرتبط
- ۶- اعلام سالانه لیست آزمایشگاههای همکار به معاونت های بهداشتی
- ۷- اعلام تعرفه آزمایشات غربالگری و تایید تشخیص و تعیین درصد نمونه گیری و انجام آزمایش با همکاری و هماهنگی اداره ژنتیک
- ۸- انتخاب و اعتبار بخشی آزمایشگاه مرجع کشوری جهت تایید تشخیص نمونه های مشکوک با هماهنگی اداره ژنتیک

رئیس دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی

- ۱- ریاست کمیته ژنتیک و ایجاد هماهنگی بین معاونت های بهداشت و درمان و سایر معاونت ها برای اجرای صحیح برنامه
- ۲- حمایت لازم برای تامین نیروی انسانی شامل مسئول فنی، کارشناس فنی و امور اداری کارآمد و کافی برای انجام کلیه امور آزمایشگاههای غربالگری، تایید تشخیص و کنترل درمان

- تبصره: بدیهی است به کارگیری نیروهای غیر ثابت مانند نیروهای طرحی در آزمایشگاههای غربالگری نوزادان، به دلیل گردش نیروها سبب عدم ثبات در روند فعالیت و کیفیت امور آزمایشگاه خواهد شد
- ۴- حمایت لازم برای تامین بودجه
 - ۵- حمایت لازم برای تامین تجهیزات پایه و ضروری برنامه
 - ۶- اطمینان از هزینه کرد مناسب بودجه های تخصیصی
 - ۷- مطالبه نتایج ارزیابی و ارزشیابی دوره ای برنامه کشوری توسط سطوح ذیربط

معاونت درمان:

- ۱- اطمینان از معرفی آزمایشگاه طرف قرارداد و اطمینان از حسن عملکرد آنها و پایش و نظارت مستمر
- ۲- هماهنگی با معاونت بهداشت در اجرای برنامه غربالگری موارد کلاسیک و عقد قرارداد با آزمایشگاه انجام دهنده
- ۳- اطمینان از تأمین امکانات لازم است انجام آزمایش های دوره ای کنترل درمان برای بیماران PKU در آزمایشگاه بیمارستان منتخب شامل نیروی انسانی، تجهیزات، فضای فیزیکی
- ۴- اطمینان از وجود هماهنگی با بخش های مختلف تحت پوشش با یکدیگر و با معاونت بهداشتی
- ۵- شرکت موثر در جلسات هماهنگی و مطالبه تشکیل جلسه هماهنگی بر حسب ضرورت

معاونت بهداشت:

- ۱- اطمینان از هماهنگی با معاونت درمان جهت نظارت و پایش آزمایشگاه طرف قرارداد برای انجام آزمایش تایید تشخیص (به روش HPLC)
- ۲- اطمینان از وجود هماهنگی بین بخش های مرتبط تحت نظر با یکدیگر و با معاونت درمان
- ۳- اطمینان از حسن عملکرد آزمایشگاههای غربالگری

اداره امور آزمایشگاههای درمان:

- ۱- نظارت بر آزمایشگاههای تایید تشخیص
- ۲- معرفی آزمایشگاههای تایید و عقد قرارداد با آنها
- ۳- نظارت بر آزمایشگاههای کنترل درمان
- ۴- هماهنگی با کارشناس مسئول آزمایشگاههای بهداشتی
- ۵- مشارکت در انجام آموزش های سطوح پایین تر
- ۶- شرکت در آموزش های ابلاغ شده در سطوح بالاتر
- ۷- تقاضای تشکیل کمیته هماهنگی بر حسب ضرورت و نیاز

کارشناس مسئول امور آزمایشگاههای بهداشتی :

- ۱- نظارت بر عملکرد آزمایشگاههای غربالگری
- ۲- هماهنگی با کارشناس مسئول آزمایشگاههای درمان
- ۳- پیگیری در اعلام فوری جواب آزمایش های مثبت از طریق تلفن و همچنین ارسال کلیه جواب هابصورت مکتوب از آزمایشگاههای غربالگری و تایید تشخیص به معاونت بهداشت دانشگاه / مرکز بهداشت شهرستان

- ۴-پایش و نظارت آزمایشگاههای غربالگری نوزادان بر اساس چک لیست مربوطه
- ۵- پیگیری و تدارک کلیه تجهیزات و کیت های مورد نیاز در هماهنگی با مسئولین مربوطه
- ۶-هماهنگی های لازم در خصوص شرکت پرسنل مراکز نمونه گیری و آزمایشگاه غربالگری در برنامه های آموزشی
- ۷-تقاضای تشکیل کمیته هماهنگی بر حسب ضرورت و نیاز

آزمایشگاه منتخب غربالگری :

- ۱-پذیرش و ثبت کلیه نمونه های DBS غربالگری و عودت نمونه های نامناسب
- ۲-انجام کلیه آزمایشات غربالگری حداکثر در ۴۸ ساعت
- ۳-اعلام جواب آزمایشات مثبت غربالگری و موارد رد نمونه به مرکز بهداشت شهرستان در اسرع وقت بصورت تلفنی / نامبر
- ۴-اعلام هر گونه عدم هم خوانی و ابهام در فرم ثبت اطلاعات که شامل : اختلاف شماره کاغذ، ثبت دو نوزاد با شماره یکسان و... به مرکز بهداشت شهرستان
- ۵- ارسال مکتوب کلیه جواب های آزمایش های انجام شده مطابق دستورالعمل
- ۶- فراهم نمودن تجهیزات و کیت های مورد نیاز
- ۷-شرکت در برنامه های آموزشی ابلاغ شده از سوی سطوح بالاتر
- ۸-مشارکت در اجرای برنامه های آموزشی ابلاغ شده پرسنل مراکز نمونه گیری

آزمایشگاه تایید تشخیص :

- پذیرش نمونه های DBS ارسالی تایید تشخیص
- انجام آزمایش فنیل آلانین بر روی نمونه های DBS ارسالی (بر اساس دستورالعمل های ابلاغی از اداره امور آزمایشگاههای درمان) با استفاده از دستگاه HPLC در حداکثر ۴۸ ساعت
- وجود مستندات عقد قرارداد با اداره امور آزمایشگاههای درمان
- ارسال مکتوب نتایج آزمایشات و اعلام نتایج مثبت حداکثر تا ۴۸ ساعت
- انجام تست تاییدی با تعرفه تعیین شده و ابلاغ شده توسط اداره ژنتیک

ارائه خدمات تشخیصی آزمایشگاه منتخب برنامه (انسیتو پاستور)

- پذیرش نمونه جهت تایید تشخیص نهایی بیماری و تعیین موارد غیر کلاسیک
- انجام آزمایش فنیل آلانین بر روی نمونه های ارسالی پلاسما با استفاده از تکنیک HPLC
- اعلام جواب ها به بیمارستان منتخب ظرف ۴۸ ساعت تا ۲ هفته بر حسب شرایط بیمار
- مشارکت در اجرای برنامه های آموزشی
- مشارکت در تدوین استانداردهای برنامه کشوری

آزمایشگاه کنترل درمان در بیمارستان منتخب PKU:

- در آزمایشگاه بیمارستان منتخب، یک نمونه پلاسما برای اندازه گیری فنیل آلانین و تیروزین و یک نمونه DBS برای اندازه گیری فعالیت آنزیم DHPR و یک نمونه ادرار جهت اندازه گیری نتوپترین و بیوپترین نوزاد تهیه می گردد و به آزمایشگاه مرجع کشوری انسیتو پاستور ارسال می گردد .
- انجام آزمایش بر روی نمونه DBS به منظور کنترل درمان در آزمایشگاه بیمارستان منتخب صورت می گیرد و تحویل پاسخ آزمایشات در زمان تعیین شده و در صورتی که امکان انجام آزمایش با دلایل مستدل در بیمارستان مقدور نباشد، لازم است نمونه بیمار اخذ و توسط آزمایشگاه

بیمارستان منتخب PKU به آزمایشگاه طرف قرارداد ارسال شود و جواب آزمایش در بیمارستان منتخب به خانواده بیمار تحویل گردد. (به نحوی که خانواده برای دادن نمونه و یا اخذ جواب به خارج از بیمارستان اعزام نشود).

مرکز بهداشت شهرستان:

- ۱- بررسی مشکلات منطقه تحت پوشش و ارسال گزارش
- ۲- ارسال جواب آزمایش HPLC (چه مثبت چه منفی)، به مرکز نمونه گیری و مرکز پوشش دهنده محل سکونت
- ۳- اعلام فوری جواب آزمایش های موارد مثبت ارسال شده از سوی آزمایشگاه منتخب غربالگری و تایید تشخیص به مراکز بهداشتی درمانی محل سکونت جهت اقدامات آتی بر اساس دستورالعمل
- ۴- نظارت بر حسن اجرای فرآیندهای نمونه گیری و پیگیری موارد فراخوان شده و اعلام فوری کارشناس آزمایشگاه شهرستان به مراکز نمونه گیری برای اخذ نمونه مناسب و ارائه گزارش به واحد مرتبط
- ۵- ارائه پیشنهادات و راهکارهای مناسب جهت حل مشکلات اجرایی به معاونت بهداشت

مراکز نمونه گیری:

- ۱- تهیه نمونه خون به روش استاندارد مطابق با دستورالعمل مربوطه
- ۲- نمونه گیری و ارسال نمونه ها به آزمایشگاه غربالگری، حداکثر تا ۲۴ ساعت
- ۳- تحویل رسید انجام نمونه گیری به والدین و راهنمایی ایشان برای پیگیری و دریافت جواب مکتوب آزمایش غربالگری
- ۴- ثبت اطلاعات و نتایج آزمایش ها در دفتر و فرم های تعیین شده
- ۵- شرکت در برنامه های آموزشی ابلاغ شده توسط سطوح بالاتر
- ۶- پیگیری دریافت متون آموزشی و دستورالعمل های مرتبط و آرشيو مناسب آنها و اطمینان از دسترس قرلر گرفتن پرسنل به آنها
- ۷- پیگیری فراهم بودن تجهیزات، پرسنل کافی و فضای مناسب

تضمین کیفیت

منظور از تضمین کیفیت فعالیتهای برنامه ریزی شده و گام به گامی است که اطمینان میدهد یک آزمایش به درستی انجام شده، نتایج آن صحیح و معتبر بوده و خطاهای احتمالی قابل کشف و اصلاح میباشند. پایش نظام مند سیستم و ارکان آن و ایجاد یک نظام کارآمد مدیریت عدم انطباق از اصول اساسی نظام مدیریت کیفیت است.

استقرار برنامه تضمین کیفیت می بایست در قسمتهای قبل از آزمایش (مدیریت نمونه)، حین انجام آزمایش (کنترل کیفیت) و پس از آزمایش، صورت گیرد.

• قبل از آزمایش:

مدیریت نمونه تاثیر مستقیم بر صحت نتایج آزمایشگاهی والبته کارایی آزمایشگاه دارد. مدیریت نمونه یکی از مهمترین جنبه های کنترل فرآیند قبل از انجام آزمایش است و موجب کاهش خطاهای این مرحله میشود. یک برنامه ی جامع مدیریت نمونه باید بتواند شناسایی بیمار، نمونه گیری، ثبت و پذیرش نمونه، نگهداری و انبارش، بسته بندی و حمل و نقل (به هنگام ارجاع نمونه) و امحاء نمونه را تحت کنترل بگیرد. برای جمع آوری نمونه یا نمونه گیری باید از روشهای مدونی استفاده شود که در آن :

تعیین هویت بیمار به درستی انجام شود.
جمع آوری در ظرف یا کاغذ فیلتر مناسب و به مقدار و در زمان مناسب انجام شود.
نمونه های غیرقابل قبول رد شوند.
نمونه ها بدرستی ثبت شوند.
ملاحظات عمومی و اختصاصی ایمنی رعایت شوند.
نمونه ها باید در مدت زمان قابل قبول به آزمایشگاه انتقال یابند.

در ثبت و پذیرش نمونه باید به این نکات توجه شود:

نکات مورد توجه در ارجاع نمونه به آزمایشگاه دیگر به شرح زیر است:
- نمونه به آزمایشگاه مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت ارجاع گردد.
- از آگاهی کارکنان نسبت به روشهای آماده سازی و ارسال نمونه اطمینان حاصل شود.
- از امنیت و وجود نگهدارنده (در صورت لزوم) اطمینان حاصل گردد.
- کم بودن حجم نمونه گرفته شده بر روی کاغذ فیلتر و بصورت پرنشدن دایره یا عدم اشباع فیلتر کاغذی یکی از رایجترین منابع ایجاد خطا در بخش قبل از تجزیه می باشد. با توجه به اینکه قطر پانچ در اندازه گیری فیل آلانین ۵ میلیمتر می باشد، پر کردن دایره از خون بسیار مهم و ضروری است. کوچک بودن لکه خون منجر به اخذ نتیجه کمتر از مقدار واقعی می شود.

• حین آزمایش (تضمین کیفیت):

آزمایشهای تشخیصی اعم از کیفی یا کمی نیازمند کنترل کیفیت هستند. روشهای کنترل کیفیت دو وظیفه برعهده دارند:

۱- تعیین وجود یا عدم وجود خطا

۲- کمک به تعیین ماهیت خطا (تصادفی یا سیستماتیک)

روشهای کنترل کیفیت به آزمایشگر کمک می کنند که خطا در هر یک از اجزای سیستم آزمایش یا Test System شامل تکنولوژیست، روش کار یا SOP، تجهیزات و ابزار پایه اعم از دستگاه، لوله آزمایش، وسایل حجم سنجی و انتقال حجم، انکوباتور و غیره، کیتها، استاندارد یا کالیبراتور، نمونه، کنترل و محیط را شناسایی کند. در روشهای کنترل کیفیت معمولاً از مواد کنترل استفاده می شود که میزان انالیت مورد نظر و دامنه ی تغییرات قابل قبول آن به یکی از روشهای معتبر مشخص شده است. استفاده از این ماده ی کنترلی در هر سری آزمایش، و مقایسه ی نتایج بدست آمده از آن با محدوده قابل قبول (مورد انتظار) به آزمایشگر کمک می کند که مشخص کند تغییرات مشاهده شده ناشی از شانس است (قابل قبول) و یا از خطا منشا می گیرد (غیرقابل قبول). الگوی تکرار تغییرات می تواند به تشخیص تصادفی بودن از سیستماتیک بودن خطا کمک کند. تعیین اقدام اصلاحی، فقط پس از تشخیص تصادفی بودن یا سیستماتیک بودن یک خطا میسر است. در کنترل کیفیت از روشهای آماری، ثبت و نمایش نموداری و اصول و قواعد مشخصی استفاده می شود که بر مبنای آنها خطاها شناسایی و ماهیت آنها معلوم می شود.

نگهداری و کنترل کیفی تجهیزات

یکی از عوامل موثر در فرایند انجام آزمایش استفاده از تجهیزات مناسب، اطمینان از صحت عملکرد و تدوین مستندات مرتبط با آن می باشد. موارد ذکر شده در ذیل چکیده ای از روش های کنترل کیفی ابزار پایه و تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاههای غربالگری است. سایر الزامات و دستورالعمل ها می بایست مطابق با استانداردهای آزمایشگاهی ارائه شده توسط آزمایشگاه مرجع سلامت، تهیه گردد

لازم بذکر است اولین قدم برای استفاده صحیح از تجهیزات آزمایشگاهی، مطالعه کامل کاتالوگها و عمل به دستورالعملهای نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می باشد.

• الایزا ریدر:

برای ارزیابی کیفیت الایزا ریدرها استفاده از چک پلیت / یا نوارهای کنترل (check strips) و در صورت دردسترس نبودن آن دو مورد، کیت تجاری توصیه می شود. با استفاده از چک پلیت یا نوار های کنترل ، صحت فتومتری ، خطی بودن و تکرار پذیری ارزیابی می گردد .

• سمپلر

سمپلر می بایست با توجه به حجم کاری آزمایشگاه بطور منظم تحت کنترل کیفیت قرار گیرد. ولی بطور کلی بررسی سمپلر حداقل هر ۳ ماه توصیه می گردد.

در حال حاضر مقادیر عدم دقت $CV\% = 2\%$ و عدم صحت $Bias\% = 3\%$ نیز در ایران قابل قبول شناخته می شود. در صورت مشاهده $CV\%$ و $bias\%$ غیر قابل قبول آزمایشگاه می تواند خود نسبت به تنظیم سمپلر اقدام و یا جهت سرویس به شرکت پشتیبان ارسال نماید. در صورت بروز ضربه به سمپلر، تأیید کیفیت مجدد ضروری است. نتایج کنترل کیفیت و هرگونه سابقه باید در فرم های مربوطه ثبت و نگهداری شوند.

- دماسنج در صورت امکان از دماسنج های دیجیتال با ثبت منحنی دمای شبانه روزی استفاده شود. دماسنج باید باید به طور سالانه کالیبره شوند.

برای اطمینان از کیفیت آب، بررسی مقاومت آن با استفاده از هدایت سنج یا کنداکتومتر پیشنهاد می گردد اندازه گیری هدایت آب باید پس از اندازه گیری دما با دماسنج کالیبره و براساس دستورالعمل هدایت سنج صورت گیرد.

در صورت خرید آب، می بایست مشخصات آب از طرف تولیدکننده ارائه گردد. پیشنهاد می شود آزمایشگاه در فواصل معین نسبت به کنترل آب خریداری شده اقدام نماید.

باید در نظر داشت انواعی از آب استریل که بصورت ویال عرضه می شود، الزاما از کیفیت مورد نیاز آزمایشگاه برخوردار نبوده و باید قبل از استفاده، میزان هدایت آن بررسی شود.

نکته: حجم ادعا شده ویالهای آب، نباید مبنایی برای به حجم رساندن کنترلها، کالیبراتورها، معرفیها و... باشد. آزمایشگاه می بایست صرف نظر از حجم مندرج روی ویال، با استفاده وسایل حجمی مناسب مانند پیپت اقدام به انتقال حجم مورد نیاز نماید.

نکات مهم در انجام آزمایشات:

- دمای اتاق باید در محدوده ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس حفظ شود.
- پانچ کردن نمونه ها دقیقا " قبل از شروع آزمایش صورت گیرد.
- برای اطمینان از پاک بودن فضای داخل پانچ بعد از برش هر نمونه، پانچ با ضربات ملایم از ذرات کاغذ فیلتر باقیمانده تخلیه گردد.
- از قرارگرفتن کامل نمونه زیر بافر اطمینان حاصل شود.
- از تماس دست با سطوح زیرین پلیت خودداری شود.
- از عدم تشکیل حباب در چاهک اطمینان حاصل شود.
- تعیین محل تاریک در اتاق به منظور مراحل انکوباسیون ضروری است.
- در صورت نمونه گیری مجدد حتما " آزمایش به صورت دوبلیکیت انجام شود.

نظر به اینکه در روش اسپکتروفوتومتری معمولاً اختلاف جذب قابل توجهی بین اولین و آخرین کالیبراتور وجود ندارد، عدم رعایت هریک از موارد فوق می‌تواند منجر به اخذ نتیجه نامناسب (مثبت یا منفی کاذب) گردد.

از آنجاییکه که آزمایش کنترل در دو غلظت و در هر سری کاری ضروری است وجود کنترل در داخل کیت الزامی می‌باشد. در صورت عدم وجود، باید کنترل از تولید کننده یا وارد کننده درخواست شود. گزارش نتایج بیماران تنها پس از اخذ نتیجه مناسب از کنترلها ممکن می‌باشد. مشخصات عملکردی کیت خصوصاً میزان تکرارپذیری و درستی نتایج که بر حسب CV% و Bias% بیان می‌شود، از موارد دیگری است که حتماً آزمایشگاهها باید در نظر داشته باشند. براساس مراجع بین المللی مقدار خطای مجاز برای اندازه‌گیری فنیل آلانین ۲۱.۶٪ می‌باشد (۸)، این مقدار خطا بدین معناست که اگر مقدار واقعی فنیل آلانین در نمونه‌ای ۱۰mg/dl باشد، در بهترین شرایط که تمامی منابع ایجاد خطا تحت کنترل است، نتایج ممکن است در محدوده ۸-۱۲ mg/dl قرائت گردد. کارکنان آزمایشگاه غربالگری می‌بایست از میزان خطای موجود در آزمایشگاه مطلع باشند و این اطلاعات را در اختیار پزشکان و کارشناسان تغذیه قرار دهند.

• پس از آزمایش:

درج صحیح نتایج در برگه گزارش دهی و نحوه گزارش فوری نتایجی که در محدوده بحرانی قرار دارند (نمونه مثبت) از جمله موارد حایز اهمیت می‌باشد

مدیریت عدم انطباق (مدیریت رخداد):

دلایل بروز خطا متنوع هستند: عدم شفاف بودن مسئولیتها، عدم وجود دستورالعمل مکتوب، نادیده گرفتن دستورالعملهای مکتوب، عدم انجام آموزش یا آموزش ناقص، عدم نگهداری مناسب کیتهای آزمایشگاهی، عدم انجام کنترل کیفی داخلی و مهارت آزمایشی، نگهداری نامناسب تجهیزات و غیره

خلاصه فرآیند مدیریت عدم انطباق: مدیریت عدم انطباق زمانی محقق میشود که سیستمی ایجاد شود تا بلافاصله پس از کشف هر

خطا یا مشکل تحقیق آغاز گردد. مراحل و توالی آنها به شرح زیر است:

- ۱- فرآیندی برای کشف همه مشکلات ایجاد شود (از بعضی مشکلات نمیتوانیم آگاه شویم مگر اینکه به دنبالشان بگردیم!)
- ۲- رخداد خطاها ثبت و نگهداری شود.
- ۳- علل جستجو و اطلاعات تجزیه و تحلیل شوند.
- ۴- اقدام اصلاحی طراحی و اجرا شود.
- ۵- یافته ها و اقدامات ثبت و نگهداری شوند.
- ۶- وقوع مجدد مشکل بطور نظام مند پایش شود.
- ۷- کسانی که خطا یا مشکل به آنها ارتباط پیدا میکند و به هر نحو ممکن است تحت تاثیر آن قرار گیرند مورد اطلاع رسانی

قرار گیرند.

تدوین و استفاده از فرم ثبت خطا و عدم انطباق و اقدامات متعاقب آن ابزار مناسبی برای مدیریت عدم انطباق محسوب میشود. این فرم باید به نحوی تهیه شود که گزارش عدم انطباق، تحقیق و اقدامات متعاقب آن، پایش و مستند سازی را تسهیل نماید

Reference:

- Norbert W. Tietz: Fundamentals of clinical chemistry. W.B. SANDERS COMPANY., ۲۰۰۶

-Hannon H. and Terrel B. "Guidelines on the Prevention and Control of Phenylketonuria", Pub. No. WHO/Hkp/pku/gl/90.4, World Health Organization, 1990.

- McCabe ERB, Lednard, Co et al, "Newborn Screening Fact Sheet". Report of the committee on Genetics, American Academy of Pediatrics., Pediatrics 113, 443 (1999)

-Evaluation of 6-year application of the enzymatic colorimetric phenylalanine assay in the setting of neonatal screening for phenylketonuria Schulze A, Mayatepek E, Hoffmann GF. Clin Chim Acta. 2002 Mar; 317(1-2):27-37

-Phenylketonuria: Screening and Management National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, October 16-18, 2000

-Enzymatic method for phenylketonuria screening using phenylalanine dehydrogenase Dooley KC. Clin Biochem. 1992 Aug; 25(4):271-5.

-SIX SIGMA -TEST INTERPRETATION GUIDELINES AS TOLERANCE LIMITS James O. Westgard, PhD. www.westgard.com

[Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs: Approved Standard—Fourth Edition CLSI 2006](#)

[Effect of specimen collection method on newborn screening for PKU Fred W. Lorey and George C. Cunningham California Department of Health Services, Genetic Disease Branch, 1151 Berkeley Way, Annex 4, Berkeley, CA, 94704, USA Available online 26 April 2005](#)

[A method of PKU screening using phenylalanine dehydrogenase and microplate system H. Narusea, Y.Y. Ohashi, A. Tsujib, M. Maedab, K. Nakamura, T. Fujii, A. Yamaguchid, M. Matsumoto and M. Shibataf \(Accepted 18 September 1991\)](#)

[Use of the Guthrie bacterial inhibition assay to monitor blood phenylalanine for dietary treatment of phenylketonuria Frances J. Rohra, Elizabeth N. Allredb, Melissa Turnera, Jane Simmonsd and Harvey L. Levya, c, d, f Available online 27 April 2005](#)

[Effect of specimen collection method on newborn screening for PKU Fred W. Lorey and George C. Cunningham accepted 15 April 1994.](#)

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold, Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra, 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Complex Script Font: B Mitra

Formatted: Font: 12 pt, Not Bold, Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra, 12 pt, Not Bold

Formatted: Font: Not Bold, Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra, Not Bold

Formatted: Font color: Auto, Complex Script Font: B Mitra

- *Determination of amino acids by ion-exchange chromatography oner paper spotted blood samples stored at different temperatures andor different periods: comparison with capillary and venous blood*
Yousef M. Abdulrazzaq*, Ahmed Ibrahim

Clinical Biochemistry ۳۴ (۲۰۰۱) ۳۹۹-۴۰۶

Available online ۱۱ October ۲۰۰۱.

Formatted: Indent: Before: 0 cm

Formatted: Font: 12 pt, Not Italic, Complex Script Font: B Mitra, 12 pt, Not Italic

-SKIN PUNCTURE ON INFANTSChapter ۱۲ Pediatric ProceduresRevised: August ۲۲, ۲۰۰۷

- استانداردهای بالینی، تدوین کمیته کشوری کنترل بیماری PKU، ۱۳۸۵

- راهنمای تشخیص بیماریهای متابولیک دکتر محمود سلطانی، ۱۳۸۸

Formatted: Right, Right-to-left

- کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاهی و فرآورده های تشخیصی ۱۳۸۸

- اصول مستندسازی و مستندات در آزمایشگاه پزشکی: انجمن آسیب شناسی ایران ۱۳۸۷

- مدیریت و کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه پزشکی: انجمن آسیب شناسی ایران ۱۳۹۱

Formatted: Font: 12 pt, Not Italic, Complex Script Font: B Mitra, 12 pt, Not Italic, (Complex Persian

Formatted: Right-to-left, Indent: Before: 0