

استانداردهای آزمایشگاهی در غربالگری نوزادان

دکتر پروین سجادیان
کارشناس مسئول بیماریهای غیر واگیر
اداره مدیریت آزمایشگاهی بهداشتی
آزمایشگاه مرجع سلامت
دی ماه ۱۳۹۱

هدف: اجرای برنامه‌های غربالگری نوزادان برای بیماری‌های CH, PKU, G6PD در سطح کشور و اهمیت اجرای استانداردهای آزمایشگاهی یکسان، در همه آزمایشگاه‌هایی فعال در این زمینه و یا برنامه‌های آتی آنها با توجه به ورود از فاز استقرار برنامه غربالگری هیپو تیروئیدی به فاز گسترش و کنترل کیفی و نیز ورود به فاز گسترش فیل کتون یوری در آزمایشگاه‌های غربالگری نوزادان و نیز گسترش غربالگری سایر بیماری‌های متابولیکی

آزمایش‌های غربالگری نوزادان جهت تشخیص بیماری‌هایی که در بدو تولد از نظر کلینیکی قابل تشخیص نمی‌باشد و با تشخیص زود هنگام قابل درمان می‌باشد، انجام می‌پذیرد. نوزادان در زمان تولد طبیعی هستند و تا چند ماه اول (۲-۳ ماه) ممکن است علائم واضحی نداشته باشند. با شروع آزمایش‌های غربالگری نوزادان، عقب ماندگی ذهنی، مرگ و میر و جلوگیری از عوارض بیماری‌های جدی نوزادان تحت پوشش کاملاً مرتفع گردیده و جان بسیاری از نوزادان سراسر جهان با اهداء سلامتی نجات یافته است. یک نوزاد عقب مانده ذهنی علاوه بر تبعات عاطفی، انسانی و فرهنگی که جهت والدین خود رقم می‌زند هزینه بسیار گزافی را نیز بر جامعه تحمیل می‌نماید.

- تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری: اغلب بیماری‌هایی که در نوزادان مورد غربالگری قرار می‌گیرند، در بدو تولد بدون علامت و یا دارای علائم غیر اختصاصی بوده و تشخیص آنها از طریق فعالیتهای آزمایشگاهی ممکن می‌باشد. عملکرد صحیح و در نتیجه اخذ جواب درست توسط آزمایشگاه باعث نجات یک انسان و برعکس جواب نادرست باعث بروز عقب ماندگی ذهنی در فرد و تحمیل عوارض ناشی از این مشکل بر خانواده و جامعه می‌گردد. توجه به موارد فوق لزوم درپیش گرفتن روندی برای به حداقل رساندن خطاها و اطمینان از نتیجه آزمایش را مطرح می‌سازد. اجرای منظم برنامه تضمین کیفیت در آزمایشگاه غربالگری، تنها راه دستیابی به نتیجه مطمئن می‌باشد و استقرار برنامه تضمین کیفیت می‌بایست در قسمتهای قبل از آزمایش، حین انجام آزمایش و پس از آزمایش صورت گیرد.

Quality Assurance

Pre analytical Errors

Analytical Errors

Post analytical Errors

- قبل از آزمایش: نمونه گیری صحیح از نوزاد با شرایط مناسب و در زمان مناسب (مواردی که آزمایش باید دوباره تکرار شود باید مورد توجه باشد). کم بودن حجم نمونه گرفته شده برروی فیلتر کاغذی 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 فنیل آلانین ۵ میلیمتر می باشد، پرکردن دایره از خون بسیار مهم و ضروری است. کوچک بودن لکه خون منجر به اخذ نتیجه کمتر از مقدار واقعی می شود. استفاده از کاغذ فیلترمورد تأیید 903 و عدم بکارگیری فیلترهای دیگر نیز از ضروریات نمونه گیری صحیح می باشد.

Sampling

- A separate room
- Specimen collection table
- Lancet
- Sterile gauze
- Isopropanol 70%
- Filter paper
- Hot water bath
- Stand rack
- Computer & Printer
- Refrigerator
- سهولت دسترسی و کیفیت عملکرد مراکز نمونه گیری

Specimen collection

- روند نمونه گیری: نوزاد در فاصله ۳ تا ۵ روز بعد از تولد
- پر کردن فرم نمونه گیری : قبل از شروع نمونه گیری شماره های پرسشنامه و کارت خونی را تطبیق داده و از یکسان بودن آنها مطمئن شوید اطمینان از یکسان بودن شماره ها بسیار مهم است .
- آماده کردن نوزاد: گرم کردن پاشنه پاشنه پا را با یک گاز یا حوله ولرم به مدت ۳ دقیقه تا جریان خون در محل افزایش یابد (حرارت ۴۱-۴۰ درجه سانتیگراد باعث افزایش جریان خون در موضع می شود).
- **نمونه گیری از نوزاد:**
- لانست زدن
- پاک کردن قطره اول خون
- ❖ قرار دادن قطرات بعدی روی فیلتر نوع فیلتر پیپر
- تمیز کردن با الکل ایزو پروپانول
- آموزش کارکنان بخش نمونه گیری و پیگیری آن در جهت اجرای صحیح و اصولی نمونه گیری، وجود پرسنل ثابت و جانشین ذیصلاح (تهیه و تکثیر پوستر و فیلم آموزشی و کاهش تعداد مراکز نمونه گیری) و بازنگری نهایی دستورالعمل کشوری
- نگهداری صحیح نمونه و انتقال آن در اسرع وقت
- عواملی که باعث تفاوت در توزیع آمینو اسید ها در ظرف یک لکه خونی می گردد نوع فیلتر پیپر، حجم خون (یا سائز لکه خونی تعیین کننده غلظت)، رطوبت، پروسه چاپ، زمان جذب خون و محل ذخیره کاغذ نحوه تلقیح خون بر روی فیلتر پیپر
- **لانست**
- کنترل کیفی از نظر نحوه بسته بندی، نقطه یابی محل اصابت سوزن ، حجم خون، نحوه آزادسازی سوزن، میزان ضربه، نوع نیدل (blade, needle) عمق ۲ mm

تضمین کیفیت فیلتر پیپر پس از چاپ

- نوع فیلتر: طبق برنامه های استاندارد CLSI استفاده از فیلتر پیپرواتمن 903 (باید دارای نام تولید کننده، شماره ساخت و تاریخ انقضاء باشد)، تهیه آنها از یک منبع استفاده از یک شماره ساخت و یک تولید کننده تاثیر بالقوه فیلتر پیپر بر روی آزمایش در تمامی نمونه ها و کالیبراتورها به حداقل می رسد تا باید آنها توسط مراجع ذیصلاح داخلی (تامین کنندگان کیت های غربالگری و مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت) و خارجی و در صورت چاپ نامناسب اطلاعات دموگرافیک بیمار روی فیلتر پیپر باعث فشار خیلی زیاد به کاغذ و باعث زمانهای جذب طولانی غیر قابل قبول و نیز باعث لایه لایه شدن لکه خونی می شود. نوع جوهر و چاپ کارتهای خونی و بسته بندی کارتهای خونی نباید در روش آزمایشگاهی تداخل نماید و مانعی در برابر گسترش خون باشد. و نیز اطلاعات قابل دسترس در مورد سازگاری تست با جوهر چاپ وجود داشته باشد. جوهر اختصاصی باید برای چاپ بکار رود
- ❖ حجم خون و یا سایز لکه خونی (تعیین کننده غلظت)، پرکردن دایره از خون بسیار مهم و ضروری است کوچک بودن لکه خون منجر به اخذ نتیجه کمتر از مقدار واقعی می شود.
- ❖ نحوه تلقیح خون بر روی فیلتر پیپر
- ❖ همو لیز (نمونه ای با گلبولهای لیز شده دارای مقادیر بیشتری فنیل آلانین از نمونه لیز نشده دارد)
- ❖ کنترل رطوبت اطاق
- ❖ وجود معیارهای قابل قبول یا رد نمونه بصورت مکتوب در آزمایشگاه و پیگیری جهت نمونه گیری مجدد نمونه هایی با کیفیت نامناسب
- ❖ ثبت زمان ارسال نمونه و استفاده از شماره گذاری متمایز در ارسال مجدد کارتهای خونی
- گزارش درصد ی ماهانه نمونه های نامناسب DBS

- ذخیره کارتهای خونی فیلتر پیپر پس از انجام آزمایشات غربالگری در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد
- ❖ مدت زمان جوابدهی حداکثر ۷۲-۴۸ ساعت از زمان تحویل نمونه به آزمایشگاه
- ❖ تشخیص بیماری از هفته دوم به بعد ممکن است به ضایعه مغزی با درجات مختلف غیر قابل برگشت منتهی شود (Golden tim)
- بررسی ویژگی های عملکردی کاغذ فیلتروارزیابی دوره ای موجود در بازار صحیح نمونه
- در چاپ از ماشین تایپ یا پرینتر استفاده نگردد چون باعث فشار به کاغذ میشود.
- هر تکنیکی که امکان خراش، فشار و دنداندار کردن کاغذ شود نباید بکار رود.
- نیمه عمر کارتهای غربالگری نوزادان چاپ شده ۲ سال می باشد و این کاغذ فاقد کربن حساس به تغییرات درجه حرارت می باشد.
- هنگامیکه کارتها از کارتن حمل و نقل خارج می شود باید در بسته بندی اصلی ذخیره شوند و بسته بندی فیلتر پیپر ها نباید باعث فشار روی آنها گردد چون فشار زیاد باعث تغییر مشخصات عملکرد آنها می گردد .

کنترل کیفی فیلتر پیپر

- ❖ جهت صحت فیلتر پیپر و برای دسترسی به جذب یکنواختی در آن از روش ایزوتوپیک استفاده می گردد. و نمونه خون تام انسانی در این روش مورد استفاده قرار می گیرد.

- Appendix C. Filter Paper Specifications
- (1) Filter paper should be made of 100% pure cotton fiber, with no wet-strength additives.
- (2) Basis weight should be 110 lb $\pm$ 5% per ream (179 g/m² $\pm$ 5%). A ream is defined as 500 sheets
- 24" x 36" (ASTM D646-96).
- (3) The pH should be 5.7 to 7.5 (Test method ISO 6588:1981).
- (4) Ash %: 0.1% maximum (Test method A of ASTM D586-97a).



1. Necessary equipment: sterile lancet with tip approximately 2.0 mm, sterile alcohol prep, sterile gauze pads, soft cloth, blood collection form, gloves.



2. Complete all information. Do not contaminate filter paper circles by allowing the circles to come into contact with spillage or by touching before or after blood collection. Keep "submitter copy" if applicable.



3. Hatched area (////////) indicates safe areas for puncture site.



4. Warm site with soft cloth, moistened with warm water up to 41°C, for three to five min.



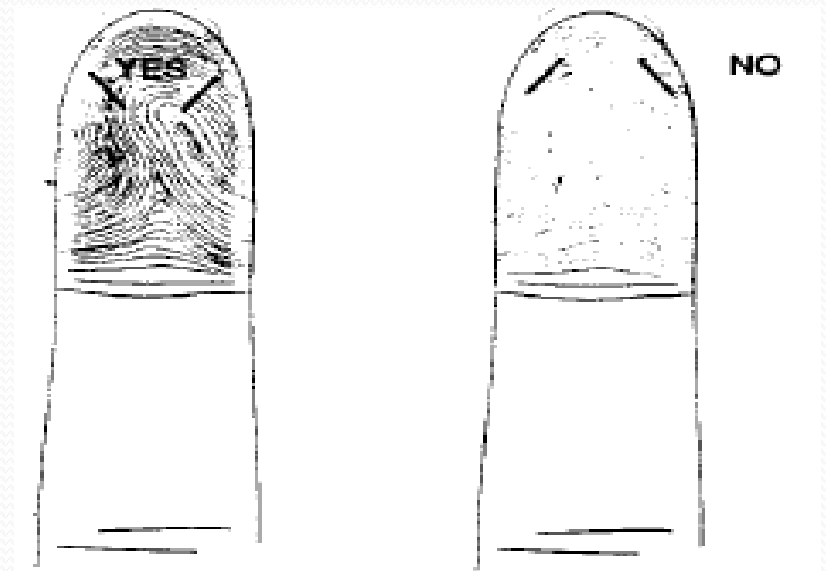
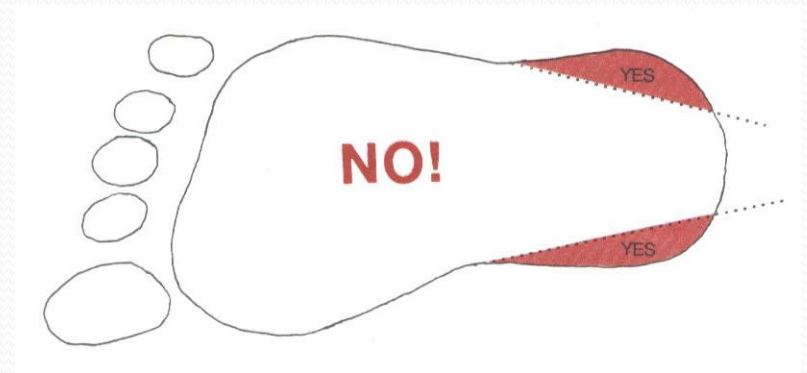
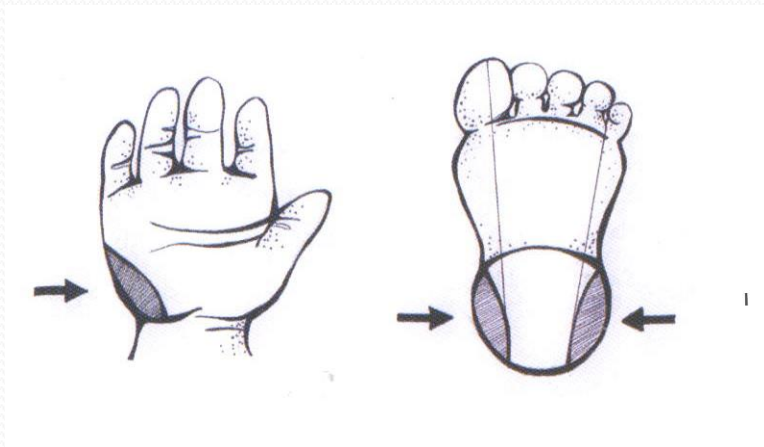
5. Cleanse site with alcohol prep. Wipe dry with sterile gauze pad.

• ویژگی های نمونه مناسب

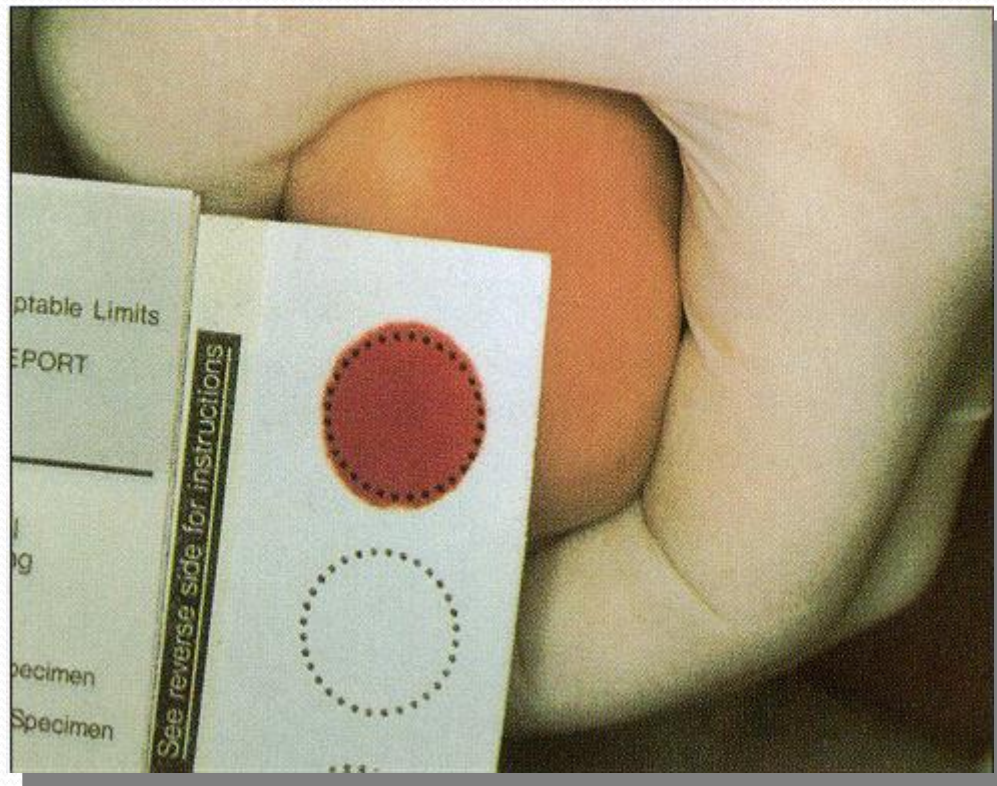
- شکل نمونه باید بصورت دایره باشد.
- قطر لکه خون بیش از ۵ میلی متر باشد.
- لکه خون از دو طرف همسان دیده شود.
- دو لکه روی هم نباشد.
- در یک دایره بیش از یک لکه نباشد .
- کاغذ فیلتر نمونه گیری آغشته به مواد خارجی نباشد.
- لکه های خون بدون اثر انگشت باشند



8. Fill remaining circles in the same manner as step 7, with successive blood drops. If blood flow is diminished, repeat steps 5 through 7. Care of skin puncture site should be consistent with your institution's procedures.



Specimen Collection



Properly collected specimen

FILL FIVE CIRCLES WITH BLOOD



BE SURE IT SOAKS THROUGH

Valid specimen:



Allow a sufficient quantity of blood to soak through to completely fill the preprinted circle on the filter paper. Fill all required circles with blood. Do not layer successive drops of blood or apply blood more than once in the same collection circle. Avoid touching or smearing spots.

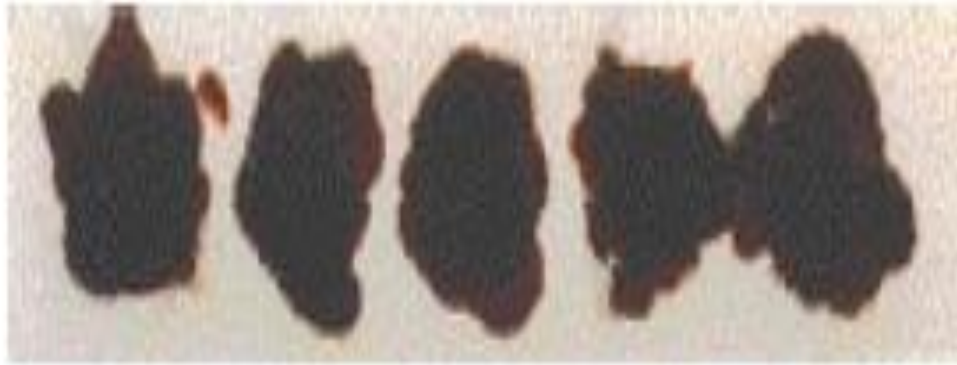
Invalid specimen and possible causes:



1. Specimen quality insufficient for testing.

Possible causes:

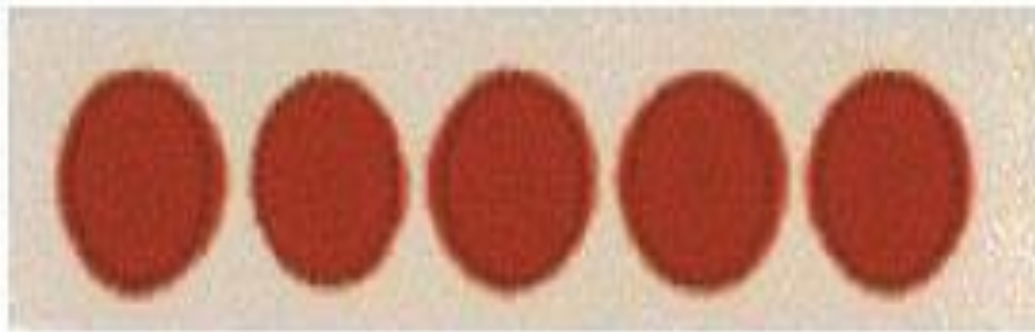
- Removing filter paper before blood has completely filled circle or before blood has soaked through to second side.
- Applying blood to filter paper with a capillary tube.
- Allowing filter paper to come into contact with gloved or ungloved hands or substances such as hand lotion or powder, either before or after blood specimen collection.



2. Specimen appears scratched or abraded.

Possible causes:

- Applying blood with a capillary tube or other device.



3. Specimen not dry before mailing.

Possible causes:

- Mailing specimen before drying for a minimum of four hours.

Invalid specimen and possible causes:



5. Specimen appears diluted, discolored or contaminated.

Possible causes:

- Squeezing or "milking" of area surrounding the puncture site.
- Allowing filter paper to come into contact with gloved or ungloved hands or substances such as alcohol, formula, antiseptic solutions, water, hand lotion or powder, etc., either before or after blood specimen collection.
- Exposing blood spots to direct heat.



6. Specimen exhibits serum rings.

Possible causes:

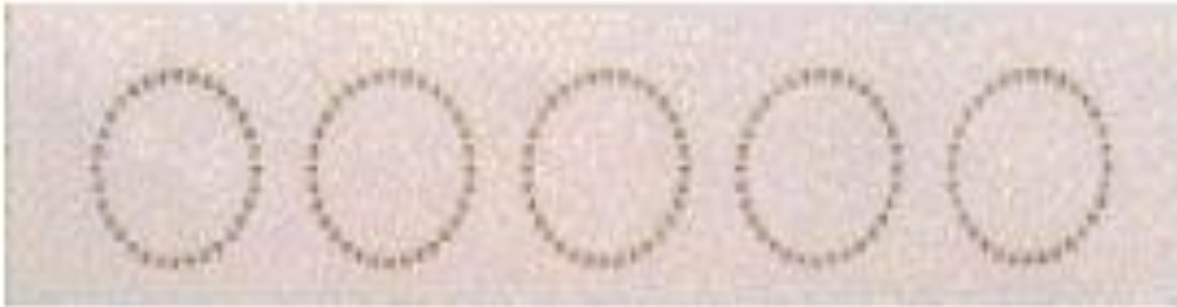
- Not wiping alcohol from puncture site before making skin puncture.
- Allowing filter paper to come into contact with alcohol, hand lotion, etc.
- Squeezing area surrounding puncture site excessively.
- Drying specimen improperly.
- Applying blood to filter paper with a capillary tube.



7. Specimen appears clotted or layered.

Possible causes:

- Touching the same circle on filter paper to blood drop several times.
- Filling circle on both sides of filter paper.



8. No blood.

Possible causes:

- Failure to obtain blood specimen.

Folds and creases through the blood circles





نمونه مناسب



کوچک و تکراری



لایه لایه



همراه مایع داخل نسجی

نمونه‌های نامناسب

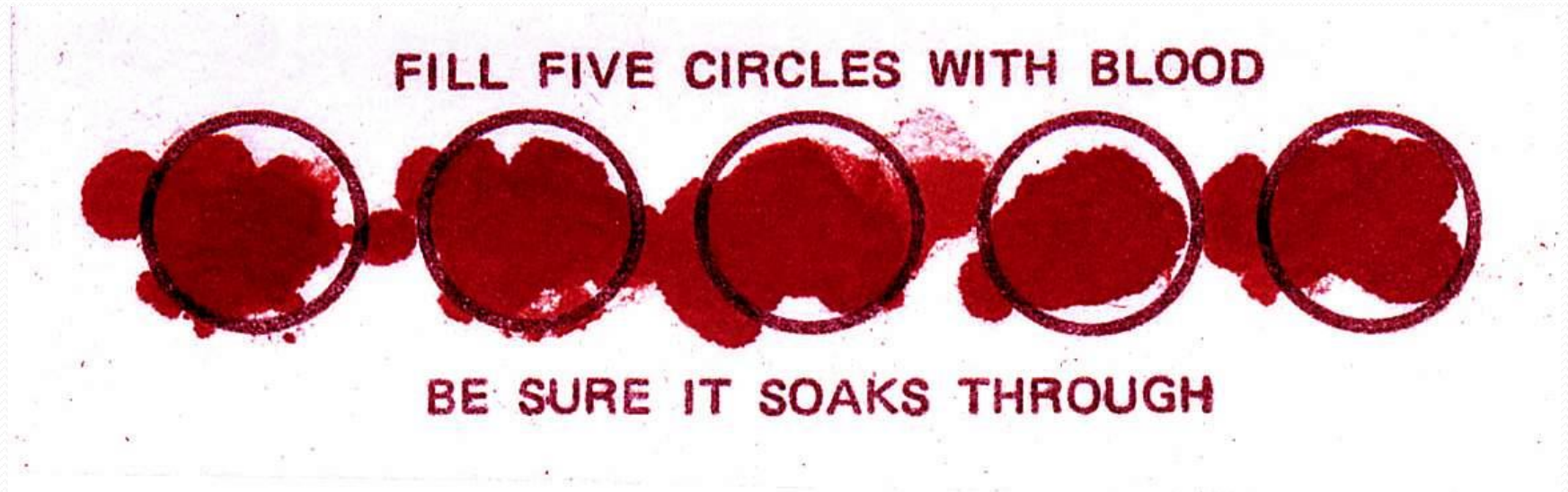


4. Specimen appears supersaturated.

Possible causes:

- Applying excess blood to filter paper, usually with a device.
- Applying blood to both sides of filter paper.

Circles not filled





9. Dry blood spots on a dry, clean, flat, non-absorbent surface for a minimum of 4 h.



10. Mail completed form to testing laboratory within 24 h of collection.

شرایط نگهداری و انتقال نمونه

- بصورت افقی روی راک مخصوص تقریباً ۳ ساعت وقت لازم است تا لکه های خون در حرارت اتاق (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) کاملاً خشک شود.
- در زمان خشک شدن از قرار دادن کارت های خونی در جریان هوای آلوده به دود و گردوغبار جداً خودداری شود از گذاشتن کارت های خونی در معرض حرارت و تابش مستقیم نور خورشید اکیدا پرهیز شود.
- هر یک از نمونه های کاملاً خشک شده را جداگانه و به ضمیمه فرم مشخصات نوزاد در پاکت مجزاویا کاغذ شیشه نما مابین کارتهای خونی قرار دهید. احتیاط کنید که خون یک نمونه با خون نمونه دیگر در تماس نباشد.
- جابجائی و حمل و نقل نمونه های خون به آزمایشگاه بدون آسیب دیدگی (فشار به فیلتر پیپر وارد نگردد) و انتقال نمونه ها در حدود ۲۴ ساعت بعد از گرفتن نمونه انجام گیرد. در صورت تعطیلی آخر هفته آزمایشگاه نمونه ها باید در یخچال نگهداری شود مواد شیمیایی و انواع دیگر نمونه ها نباید در ظرف حمل کارتهای خونی بسته بندی شوند کارت های حاوی لکه های خون در پاکت های پلاستیکی زیپ دار و حاوی سیلیکاژن در حرارت (۴) درجه یخچال و میزان رطوبت کمتر از ۳۰ درصد تا (۲ سال) و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت طولانی (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 کارتهای معرف کنترل گردد. چراکه رطوبت بر روی پایداری نمونه نقش تعیین کننده دارد
- نمونه های اخذ شده در اسرع وقت به آزمایشگاه غربالگری مرجع در مرکز استان ارسال شوند.
- وجود معیارهای قابل قبول یا رد نمونه بصورت مکتوب در آزمایشگاه و مراکز نمونه گیری
- گزارش درصد ی ماهانه نمونه های نامناسب DBS
- تهیه گزارش کامپیوتری پذیرش و جوابدهی (تدوین برنامه چگونگی انتقال اطلاعات پذیرش و جوابدهی آزمایشگاههای غربالگری نوزادان از محیط به ستاد بر اساس سیستم پرتال
- اقدام به انجام آزمایش طی ۴۸ ساعت پس از تحویل نمونه

Appendix D. Blood Spot Drying Device



Figure reprinted with kind permission of Schleicher & Schuell BioScience, Inc.

دریافت نمونه های فیلتر پیپر (DBS) توسط آزمایشگاهها



پذیرش (نرم افزار پذیرش و جوابدهی)



انجام آزمایش



جوابدهی (نرم افزار پذیرش و جوابدهی)