

۱- قبل از انجام آزمایش

۱-۱: آماده سازی بیمار: به پرسنل پذیرش آزمایشگاه و آزمایشگاه های ارجاع طی نامه و آموزش های کتبی و شفاهی تمام اطلاعات در خصوص

هفته مناسب بارداری برای Double marker (۱۱ هفته تا ۱۳ هفته و شش روز) ، Triple marker (۱۵ هفته تا ۱۷ هفته و ۵ روز) ، Quad

marker (۱۵ هفته تا ۱۷ هفته و ۵ روز) انجام شده است. هنگام پذیرش تمام اطلاعات لازم مطابق فرم پرسشنامه غربالگری سلامت جنین به

همراه آفرین جواب سونوگرافی دریافت می گردد. (تاریخ انجام سونوگرافی می بایست همان روز انجام آزمایش تا حداکثر چند روز قبل باشد)

۱-۲: نمونه گیری: نمونه مورد نیاز به پرسنل نمونه گیری و آزمایشگاه های ارجاع دهنده نمونه آموزش های به صورت کتبی در قالب کتابچه

راهنمای آزمایش ها داده شده است، بیمار نیاز به ناشتا بودن ندارد، حجم خون مورد نیاز برای آزمایش دابل مارکر: ۳ میلی لیتر خون لخته، تریپل

مارکر: ۳ میلی لیتر خون لخته، کواد مارکر: ۴ میلی لیتر خون لخته می باشد)

برای آزمایش به تنهایی AFP سرم و پلاسما EDTA یا مایع آمنیوتیک مورد قبول می باشد

۳-۱: جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه:

۳-۱-۱: جداسازی: به پرسنل بخش جداسازی و آزمایشگاه های ارجاع دهنده نمونه آموزش های لازم در خصوص جداسازی، نگهداری و ارسال نمونه

به صورت کتبی در قالب کتابچه راهنمای آزمایش ها داده شده است، نمونه خون پس از نمونه گیری حداکثر نیم ساعت در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵

سانتیگراد) نگهداری شده و در دور ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و جداسازی انجام شود. سرم مورد نیاز برای دابل

مارکر ۱/۵ میلی لیتر، تریپل مارکر ۱/۵ میلی لیتر، کوادمارکر ۲ میلی لیتر که همولیز واضح نداشته، لیپمیک نبوده و ایکتریک نباشد. برای جداسازی

در لوله ۱۳×۷۵ میلی متر با درب لوله مناسب، بهتر است استفاده شود و می بایست برچسب مناسب مداخل حاوی نام و نام خانوادگی، سن

بیمار، شماره شناسایی و یا بیشتر شامل زمان و تاریخ نمونه گیری و جداسازی باشد.

جداسازی پلاسما EDTA و مایع آمنیوتیک حاوی خون بلافاصله بعد از نمونه گیری در دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه می باشد.

۳-۱-۲: نگهداری: برای نگهداری سرم حداکثر پنج روز و پلاسما و مایع آمنیوتیک، ۳ روز در دمای c. ۲-۸ و شش ماه در دمای c. ۲۰- یا دمای

پایین تر مناسب است

۳-۱-۳: بسته بندی و ارسال نمونه: برای بسته بندی و ارسال نمونه ها اگر مسافت کوتاه است (کمتر از دو ساعت) استفاده از یخ ژل و نمونه

ها در سه لایه پوشش حفاظتی در دمای یخچالی (دما تحت کنترل باشد) درون یونولیت یا فلاسک نمونه، مناسب است و اگر طی مسافت بیش از

دو ساعت است، نمونه در سه لایه پوشش حفاظتی درون یونولیت یا فلاسک حمل نمونه می تواند کنار یخ ژل (زیاد) برای تامین دمای یخچالی (یا

کنار یخ خشک به صورت منجمد منتقل شود. (مقدار کافی یخ خشک استفاده شود و توجه داشته باشید حجم یخ خشک در فضای بسته یونولیت یا

فلاسک حمل نمونه در دمای محیط، هر ۲۴ ساعت نصف می شود)

برای جداسازی نمونه های ارجاع داده شده می بایست مشخصات بیمار ثبت شده بر روی برچسب لوله با برگه درخواست کاملاً انطباق داشته باشد و

در غیر اینصورت می بایست پیگیری جهت رفع اشکال موجود اقدام شود.

به ندرت اتفاق می افتد از سوی بیمار یا آزمایشگاه ارجاع، درخواست تغییر اطلاعات داده می شود که شاید به دلیل تبدیل نام مستعار به نام شناسنامه ای یا تغییر نام خانوادگی، سن بیمار یا هر اطلاعات دیگر، که می بایست طی یک نامه رسمی از سوی آزمایشگاه ارجاع و یا یک درخواست رسمی از سوی بیمار باشد.

۲- مرحله انجام آزمایش

۲-۱: کنترل داخلی: برای تمام آزمایش های مربوط به غربالگری جنین شامل AFP، BhCG، Free Estriol، Inhibin-A، Papp-A، Free BhCG، حداقل دو سطح کنترل در هر نوبت کاری انجام شده و منمنی لوی جنینک رسم شده و با قوانین وستگارد تفسیر روزانه پس از ورود کنترل های روزانه انجام می شود.

۲-۲: راستی آزمایی کیت ها (Verification): راستی آزمایی کیت های مورد استفاده از نظر ممدوده قابل اندازه گیری (AMR)، مد

تشخیص (LOD)، دقت (Precision) و درستی روش (Trueness) سالی یکبار انجام می گردد.

۲-۲-۱: ممدوده قابل اندازه گیری (AMR): غلظتی از نمونه سرم که حدود ۹۵٪ مداخل دامنه سنجش کیت مورد استفاده را انتفا ب کرده و رقت های متوالی ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶ و ... به طوریکه آخرین رقت مناسبه شده از غلظت اصلی کمی بالاتر از حداقل دامنه سنجش (۵٪) را تهیه می کنیم و سپس سنجش مقدار رقت های تهیه شده را به دست می آوریم و با استفاده نرم افزار آماری همبستگی (R^2) میان نتایج غلظتی مناسبه شده با OD های به دست آمده یا با غلظت های اندازه گیری شده به دست می آید.

۲-۲-۲: مد تشخیص (LOD): با استفاده از شیوه نامه CLSI EP17-2003 ابتدا می بایست LOB به دست آید و سپس LOD مناسبه شود. برای بدست آوردن LOB در روش های CLIA، ECLIA و الیزا (کالیبراتور صفر، Universal diluent) ۲۰ بار در یک دور یک روز سنجش شده و SD میانگین مناسبه شده و با فرمول زیر LOB بدست می آید $LOB = \text{Mean}_{\text{blank}} + 1.65 * SD_{\text{blank}}$ و برای بدست آوردن LOD از کوچکترین غلظت کالیبراتور یا نمونه ای که نزدیک به آن باشد استفاده کرد که در ۴ نوبت کاری هر بار سنجش انجام شد و SD را مناسبه کرده و از فرمول زیر LOD بدست می آید. $LOD = LOB + 1.65 SD_{\text{blank}}$

۲-۲-۳: دقت (precision): برای بررسی Within Run یک نمونه سرم که مقدار آن در مد نزدیک به مقدار گفته شده برای دقت درون دور بررورشور کیت باشد انتفا ب شده و ۲۰ بار در یک نوبت کاری انجام می شود و از نتایج بدست آمده SD و CV مناسبه می شود که CV بدست آمده می بایست کمتر یا برابر ادعای کیت باشد. برای بررسی Between Run از دو سطح کنترل که در بیست روز کاری انجام شده است، SD و CV مناسبه می شود می بایست کمتر یا برابر ادعای کیت باشد.

۲-۲-۴: درستی روش (Trueness): برای بررسی صحت سه نمونه برای دابل مارکر و سه نمونه برای کواد مارکر به آزمایشگاه معتبر در زمینه غربالگری سلامت جنین ارسال می شود و بین هر شش آزمایش همبستگی (R^2) بررسی می شود.

۲-۳: استفاده از Run control: برای تمام آزمایش های غربالگری سلامت جنین شامل AFP، BhCG، Free Estriol، Inhibin A، Free

Papp-A، BhCG که روزانه تعدادی از هر کدام آن ها روز بعد تکرار می شود و به صورت سه ماه یکبار از نظر همبستگی (R^2) بررسی می شود.

۲-۴: مناسبه مقادیر مدیان: مقادیر مدیان ماهانه از طریق نرم افزار Benetech به دست می آید که می بایست در ممدوده تغییرات بین ۰/۹ تا ۱/۱ باشد.

۲-۵: شرکت در EQAS: سالیانه دو بار برنامه ارزیابی خارجی کیفیت (پیشگاه ایرانیان) شرکت کرده و CV، SDI، Deviation هر آزمایش مورد بررسی قرار می گیرد. شرکت در برنامه ارزیابی خارجی RIQAS برای دو آزمایش AFP و BhCG که سالیانه ۱۲ بار ارزیابی انجام می گردد و CV، SDI و Deviation و ... مورد بررسی قرار می گیرد.

۲-۶: مناسبه IPR : IPR (Initial Positive Rate) تعداد موارد مثبت (T13، T18، T21، SLOS و OSB) در دابل مارکر، تریپل مارکر و کواد مارکر به کل تعداد مراجعات بررسی شده IPR% بدست آمده و ماهانه تحلیل می گردد.

۲-۷: بررسی طولانی مدت عملکرد آزمایشگاه: شافص های (DR (Detection Rate و FPR (False Positive Rate ماهانه برای تمام موارد مثبت (T13، T18، T21، SLOS و OSB) در دابل مارکر، تریپل مارکر و کواد مارکر با تمام بیماران (دارای ریسک مثبت) و درصدی از بیماران دارای ریسک منفی تماس گرفته شده و سلامت نوزاد سوال شده و نسبت به کل تعداد مراجعات بررسی شده DR% و FPR% مناسبه می گردد.

۲-۸: نگهداشت و کالیبراسیون: انجام نگهداشت و کالیبراسیون تجهیزات مورد استفاده مطابق برنامه انجام می شود. به این صورت که حداقل سالی یک بار سرویس و کالیبراسیون صورت می گیرد.

۲-۹: نرم افزار معتبر و تصدیق عملکرد نرم افزار: نرم افزار معتبر بوده (Benetech) و تصدیق عملکرد نرم افزار از نظر صحت مناسبه سن بارداری، سن مادر و ... هر روز کاری انجام شده و پس از هر بار به روز رسانی نرم افزار هم کنترل می گردد.

۳- بعد از انجام آزمایش

۳-۱: کنترل نتایج وارد شده: جواب های وارد شده با سیستم LIS شامل AFP، Free estriol، Papp-A، Free BhCG می باشد و به صورت دستی آزمایش Inhibin-A می باشد که آزمایش افیر پس از ورود در نرم افزار توسط فرد دیگر کنترل می شود.

۳-۲: کنترل اطلاعات وارد شده از پرسشنامه و گزارش سونوگرافی در نرم افزار Benetech: تمام اطلاعات وارد شده توسط فرد وارد کننده اولیه و توسط فرد تایید کننده قبل از امضاء مسئول فنی کنترل می شود.

۳-۳: کنترل زمان جوابدهی: جوابدهی آزمایش ها با رسم منحنی حداکثر ۷۲ ساعته انجام گردد مگر در مواردی که خود آزمایشگاه ارسال کننده در ارایه اطلاعات نقص داشته است.

۳-۴: نگهداری نمونه ها: نمونه های سرمی منفی یک هفته و نمونه های مثبت پس از انجام آزمایش به مدت شش ماه در دمای ۲۰-۰ نگهداری می شود.

۳-۵: نگهداری نتایج آزمایش ها و منحنی غربلگی سلامت جنین: نتایج آزمایش حداقل به مدت ۱۵ سال و منحنی های غربلگی از اولین روز کار با نرم افزار نگهداری می شود.

منابع :

۱- پک لیست ارزیابی آزمایشگاه پزشکی برای غربلگی ناهنجاری های کروموزومی جنین با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی - آزمایشگاه مرجع سلامت - ۱۴۰۱

۲- مدیریت کیفیت در بیوشیمی - دکتر رضا مومنی

۳- CLSI EP17-2003