



معاونت درمان

شناسنامه و استاندارد خدمت

آزمایش سنجش کمی آمینواسیدها در نمونه پلاسما با استفاده از روش HPLC

تابستان ۱۴۰۲

تنظیم و تدوین اولیه:

دکتر عاطفه باقرصاد (رئیس اداره ژنتیک)
دکتر علی محبی (مسئول بخش متابولیک آزمایشگاه غربالگری بیماری های متابولیک ارثی مرکز تحقیقات رشد و تکامل)
دکتر سعید طالبی (عضو کمیته فنی بیماری های متابولیک ارثی، رئیس گروه ژنتیک دانشگاه ایران)
ناهید وفائی (مسئول بخش متابولیک آزمایشگاه غربالگری بیماری های متابولیک ارثی مرکز تحقیقات رشد و تکامل)
دکتر صغری روحی (عضو کمیته تضمین کیفیت بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر سامان ناهید (مسئول فنی آزمایشگاه فرزندگان-منتخب غربالگری بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر فرزاد کبارفرد (مسئول فنی آزمایشگاه آگاهان هدف-منتخب غربالگری بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر مرجان اصفهانی زاده (مسئول بخش متابولیک آزمایشگاه غربالگری بیماری های متابولیک ارثی آگاهان هدف)
دکتر محمد رضا مهدوی (مسئول فنی آزمایشگاه فجر ساری-منتخب غربالگری بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر صدیقه شمس (مسئول فنی آزمایشگاه مرکز تحقیقات رشد و تکامل-منتخب غربالگری بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر محمدجعفر سلیمانی (مسئول فنی آزمایشگاه رازی-منتخب غربالگری بیماری های متابولیک ارثی)
فاطمه قائمی (مسئول بخش متابولیک آزمایشگاه غربالگری بیماری های متابولیک ارثی رازی)
فاطمه قربانی (مسئول بخش متابولیک آزمایشگاه غربالگری بیماری های متابولیک ارثی فجر)
دکتر علی ناظری (کارشناس مسئول آزمایشگاه - اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت)
زهرا کلهر (کارشناس غربالگری نوزادان برای بیماری های متابولیک ارثی)
دکتر کوروش اعتماد (مدیرکل دفتر مدیریت بیماری های غیرواگیر)

با همکاری:

دفتر مدیریت بیماری های غیرواگیر معاونت بهداشت

آزمایشگاه مرجع سلامت معاونت درمان

نایبیده نهایی:

جناب آقای دکتر ربانی دبیر بورد رشته فوق تخصصی غدد درون ریز و متابولیسم کودکان

جناب آقای دکتر طالع فوق تخصص غدد درون ریز و متابولیسم کودکان/ دانشگاه علوم پزشکی تهران

جناب آقای دکتر توانگر دبیر بورد رشته تخصصی آسیب شناسی

جناب آقای دکتر امینی فرد رییس انجمن علمی آسیب شناسی ایران

جناب آقای دکتر محمد جواد غروی

مشاور: دکتر ساناز بخشنده رییس گروه تدوین استاندارد و راهنمای بالینی معاونت درمان

تحت نظارت فنی:

گروه استانداردسازی و تدوین راهنماهای سلامت

دفتر ارزیابی فن آوری، استانداردسازی و تعرفه سلامت

مقدمه:

الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین):

- پروفایل آمینواسید در پلاسما با استفاده از روش HPLC
- Amino Acid profile in Plasma by HPLC

آزمایش اندازه گیری کمی آنالیت (ها) با استفاده از کروماتوگرافی ستونی (مانند گاز، مایع و HPLC)

کد ملی: ۸۰۰۷۸۰

ب) تعریف و تشریح خدمت مورد بررسی:

متابولیک، یا تجزیه و تحلیل جامع از ترکیباتی با وزن مولکولی کم در نمونه های بیولوژیکی، یک چشم انداز جدید در جستجوی نشانگرهای زیستی بیماری است که ارزیابی طیف گسترده ای از متابولیت ها را امکان پذیر می کند و تأثیر قابل توجهی در کشف نشانگرهای زیستی، تشخیص بیماری ها و شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی مختل شده دارد. متابولیت های مولکول های کوچک از جمله لیپیدها، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات ها، ویتامین ها، پپتیدها، اسیدهای نوکلئیک، تیول ها و اسیدهای آلی، به عنوان شاخص های اصلی در سیستم های بیولوژیکی، دارای اهمیت هستند و به عنوان وسیله ای برای درک فنوتیپ های بیماری در نظر گرفته می شوند. تحقیقات بر روی بیومارکرها، تأثیر بسزایی در علم پزشکی داشته و پیشرفت های اخیر در دانش و فناوری متابولیک، منجر به شکوفایی تحقیقات بسیاری شده است.

بسیاری از بیماری ها منجر به ایجاد تغییرات خاص و مشخصی در پروفایل های شیمیایی و بیوشیمیایی مایعات بیولوژیکی قبل از بروز علائم بالینی می شوند. این تغییرات، اغلب برای اهداف تشخیصی و پیش آگهی مفید هستند. شناسایی نشانگرهای زیستی که می توانند برای تشخیص زودهنگام بیماری مورد استفاده قرار گیرند منجر به درمان مؤثرتر، کاهش رنج و مرگ و میر می شوند. پیشرفت در متابولومیک، تکنیک های تحلیلی و تجزیه و تحلیل داده ها، از پتانسیل فوق العاده ای برای کاربرد در آسیب شناسی تشخیصی برخوردار است.

در حال حاضر بسیاری از متدهای متابولومیک در دست توسعه هستند و بطور معمول در کارهای بالینی به کار می روند که یک ابزار موثر برای نظارت بر نوسانات سطح متابولیت در فلوئیدها به شمار می آیند. تشخیص متابولیت، چه بصورت جداگانه و چه به صورت گروه، به عنوان یک پروفایل متابولیک، معمولاً با استفاده از تکنیک های تحلیلی و به دنبال آنالیز داده های چند متغیره پیچیده، در بیوفلوئیدها انجام می شود. هدف از این

تلاش‌ها شناسایی متابولیت‌هایی است که به طور منحصر به فرد با یک بیماری خاص انسانی در ارتباط هستند تا امکان تشخیص دقیق بیماری‌ها فراهم شود.

HPLC نیز یکی از این روش‌ها می‌باشد که با جداسازی اجزای موجود در یک نمونه مایع در ستون کروماتوگرافی، زمینه اندازه‌گیری دقیق آن ترکیبات را توسط دتکتور فراهم می‌آورد. با توجه به کاربردهای گسترده روش HPLC، استفاده از آن در سال‌های اخیر بطور چشمگیری افزایش داشته است. یکی از بزرگترین کاربردهای دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، آنالیز آمینو اسیدها در نمونه‌های مختلف می‌باشد که بیشتر متوجه حوزه‌های صنایع غذایی، پزشکی و بیوتکنولوژی می‌باشد.

آمینو اسیدها از ترکیبات تشکیل‌دهنده پروتئین هستند و پروتئین‌ها ترکیباتی هستند که نقش اساسی در فعالیت بدن ایفا می‌کنند. اسید آمینه‌ها در حالت کلی به دو دسته ضروری و غیر ضروری تقسیم‌بندی می‌شوند. آمینو اسیدهای ضروری آنهایی هستند که بدن قادر به تولیدشان نیست و باید از منابع غذایی برای بدن تامین شوند. یکی از روش‌های سنجش مقدار آمینو اسیدها، استفاده از روش دقیق و سریع HPLC در آزمایشگاه می‌باشد.

نمونه مورد نیاز برای سنجش آمینو اسیدها به روش HPLC نمونه پلاسما می‌باشد که می‌بایست توسط پزشک، پرستار، کارشناس آزمایشگاه و سایر کارکنان که برای این کار آموزش دیده و تجربه کافی دارند، به شرح ذیل گرفته شود:

- حداقل 2ml خون لازم می‌باشد.
- پس از خونگیری وریدی با استفاده از سرنگ یا سیستم Venoject، نمونه خون به درون لوله هپارینه (دار EDTA) انتقال داده شود (اگر از سرنگ استفاده میشود سر سوزن خارج شده و خون به آرامی از کناره داخلی لوله اضافه شود) و حدود ۳ الی ۵ دقیقه به آرامی مخلوط شود.
- گلوبول‌ها باید کمتر از ۱۰ دقیقه از پلاسما جدا شوند.
- نمونه باید در سانتیفریوژ یخچال دار ترجیحاً با دمای $4-8^{\circ}\text{C}$ و دور 3000rpm به مدت ۱۰ دقیقه جدا شود و به میکروتیوب یا لوله مناسب در بسته، همراه با اطلاعات بیمار انتقال داده شود.
- نمونه پلاسما می‌بایست بلافاصله در همان روز نمونه‌گیری با رعایت شرایط استاندارد بسته‌بندی و انتقال امن و ایمن نمونه، در شرایط دمایی خنک $2-8^{\circ}\text{C}$ به آزمایشگاه حمل شود. در غیر این صورت نمونه‌ها باید تا زمان آزمایش در شرایط دمایی حداقل $20^{\circ}\text{C}-$ و در حالت ایده آل در $70^{\circ}\text{C}-$ حفظ شوند.
- در صورت عدم دسترسی به سانتیفریوژ، خون هپارینه در کنار یخ تا ۳۰ دقیقه پایدار خواهد بود.
- نمونه پلاسما به مدت ۱۴ روز در فریزر $20^{\circ}\text{C}-$ پایدار خواهد بود.

- نمونه هایی که بصورت پلاسما نیستند و یا در شرایط گرما ارسال شده اند و همچنین نمونه هایی که لیز شدید هستند، مورد تأیید نمی باشند.

به طور کلی عوامل زیر در حساسیت آزمایش سنجش آمینواسیدهای پلاسما و اعتبار نتایج آن مهمترین تاثیر را دارند:

- نمونه برداری و نحوه جمع آوری نمونه (مهارت نمونه گیر).
- زمان و مرحله بیماری
- رژیم غذایی و داروهای مصرفی
- رعایت استانداردهای تضمین کیفیت آزمایشگاهی در نگهداری و ارسال نمونه و انجام آزمایش
- نوع کیت یا راهنمای آزمایشگاهی که برای تشخیص مورد استفاده قرار می گیرد.

(ت) موارد ضروری انجام مداخله تشخیصی (اندیکاسیون ها):

- مدیریت مراقبت و درمان موارد سرپایی:
- در صورت بالا بودن رنج آنالیت ها، تماس با بیمار و پزشک معالج.
- خدمات تشخیص و درمان بیماران بستری:
- در صورت بالا بودن رنج آنالیت ها، تماس با بخش بستری بیمارستان

(ج) تواتر ارائه خدمت:

ج-۱) تعداد دفعات مورد نیاز:

بر اساس شرح حال و سیر بالینی بیمار طبق صلاحدید و درخواست پزشک و بر اساس آخرین ضوابط و دستورالعمل های ابلاغی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

ج-۲) فواصل انجام:

بر اساس شرح حال و سیر بالینی بیمار طبق صلاحدید و درخواست پزشک و بر اساس آخرین ضوابط و دستورالعمل های ابلاغی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

(د) افراد و مراکز صاحب صلاحیت جهت تجویز (Order) خدمت مربوطه و استاندارد تجویز:

ه) افراد صاحب صلاحیت جهت ارائه خدمت مربوطه:

- **نمونه گیری:** نمونه گیری وریدی با استفاده از سرنگ یا سیستم Venoject توسط پزشک، پرستار، کارشناس آزمایشگاه و سایر کارکنان مرتبط که برای این کار آموزش دیده و تجربه کافی داشته باشند، انجام می شود. با توجه به آنکه نمونه گیری در محلی غیر از آزمایشگاه نیز قابل انجام است، نمونه گیر و افراد مرتبط باید با ضوابط ارجاع امن و ایمن نمونه، ابلاغ شده توسط وزارت بهداشت، آشنا باشند. فرآیند مدیریت نمونه تحت نظارت مسئول فنی آزمایشگاه انجام دهنده آزمایش می باشد.
- **انجام آزمایش:** آزمایش سنجش آمینواسیدها به روش HPLC از آزمایشهای تخصصی بوده که فقط در آزمایشگاههای صاحب صلاحیت باید انجام شود. این آزمایشگاهها باید طبق بخشنامه ها و دستورالعمل های ابلاغی و مطابق آیین نامه تاسیس و مدیریت آزمایشگاههای پزشکی، الزامات تضمین کیفیت و اصول ایمنی و امنیت زیستی را رعایت کرده و در برنامه های مهارت آزمایی مورد تایید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی شرکت نموده و نتیجه قابل قبول اخذ نمایند. این آزمایشگاهها بر اساس چک لیستهای ابلاغی وزارت بهداشت به صورت دوره ای توسط مدیریت امور آزمایشگاههای دانشگاههای تابعه باید مورد ارزیابی قرار گیرند.
- **افراد دارای صلاحیت انجام آزمایش:** کارکنان آزمایشگاه آموزش دیده، تحت نظارت مسئول فنی آزمایشگاه (مدارک تحصیلی مورد تایید کارکنان برای انجام آزمایش) مشخص شده اند. مسئول فنی صاحب بر اساس آخرین دستورالعمل های وزارت متبوع (با ذکر تاریخ و شماره در بخش مرجع مشخص شده است)، مسئولیت کل فرآیند مدیریت نمونه، روند انجام آزمایش، تضمین کیفیت آزمایش، گزارش دهی، یافتن خطاهای احتمالی در روند ارائه خدمت آزمایشگاهی، پاسخگویی به پزشک و بیماران و دیگر ذی نفعان و سایر وظایف مرتبط و همچنین آگاهی و رعایت ضوابط تعیین شده از طرف وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی را برعهده دارد.

و) عنوان و سطح تخصص های مورد نیاز (استاندارد) برای سایر اعضای تیم ارائه کننده خدمت:

ردیف	نیروی انسانی	تعداد موردنیاز به ازای ارائه هر خدمت	میزان تحصیلات مورد نیاز	سابقه کار و یا دوره آموزشی مصوب در صورت لزوم	نقش در فرایند ارائه خدمت
------	--------------	--------------------------------------	-------------------------	--	--------------------------

۱	نمونه گیر	۱ نفر (با توجه به حجم کاری می تواند متفاوت باشد)	پزشک، پرستار، کارشناس آزمایشگاه، کاردان، بهورز، کارشناس مراقب سلامت و سایر کارکنان که برای اینکار آموزش دیده و تجربه کافی داشته باشند.	پس از گذراندن آموزش تئوری و عملی مرتبط و تأیید صلاحیت توسط مسئول فنی	نمونه گیری طبق دستور العمل مربوطه، بسته بندی و ارجاع نمونه طبق دستور العمل انتقال امن و ایمن نمونه.
۲	کارکنان آزمایشگاه	۱ نفر (با توجه به حجم کاری می تواند متفاوت باشد)	کاردان و کارشناس علوم آزمایشگاهی، کارشناسی ارشد و PHD شاخه های علوم آزمایشگاهی، بیوشیمی بالینی، کارشناس ارشد سم شناسی مشروط به دارا بودن تحصیلات پایه علوم آزمایشگاهی	پس از گذراندن آموزش تئوری و عملی مرتبط و تأیید صلاحیت توسط مسئول فنی	انجام آزمایش گزارش دهی نتایج
۳	مسئول فنی	۱ نفر	دکترای حرفه ای علوم آزمایشگاهی، متخصص علوم آزمایشگاهی بالینی، متخصص آسیب شناسی بالینی، دکتری بیوشیمی بالینی در بخش مربوطه	مطابق بخشنامه و ضوابط ابلاغی وزارت بهداشت	وظایف مسئول فنی بر اساس آخرین دستورالعمل ها و بخشنامه های ابلاغی (آئین نامه تاسیس و مدیریت آزمایشگاههای پزشکی)
۴	مسئول کنترل کیفی	۱ نفر	کارشناس علوم آزمایشگاهی، کارشناسی ارشد و PHD در یکی از شاخه های علوم آزمایشگاهی، کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، کارشناس ارشد سم شناسی مشروط به دارا بودن تحصیلات پایه علوم آزمایشگاهی، متخصص علوم آزمایشگاهی بالینی که می تواند از تخصص آسیب شناسی بالینی، دکتری بیوشیمی بالینی در بخش مربوطه. توضیح: مسئول کنترل کیفی می تواند یکی از کارکنان فنی پس از احراز صلاحیت توسط مسئول فنی انتخاب شود و یا شخص مسئول فنی عهده دار آن باشد.	پس از گذراندن آموزش تئوری و عملی مرتبط و تأیید صلاحیت توسط مسئول فنی	تضمین کیفیت در فرآیند آزمایش
۵	مسئول پذیرش و جوابدهی	۱ نفر (با توجه به حجم کاری می تواند متفاوت باشد)	حداقل دیپلم با تایید مسئول فنی کارشناس آزمایشگاه	پس از گذراندن آموزش تئوری و عملی مرتبط و تأیید صلاحیت توسط مسئول فنی	پذیرش و ثبت اطلاعات بیمار و ارسال جواب آزمایش
۶	نمونه گیر	۱ نفر (با توجه به حجم کاری می تواند متفاوت باشد)	پزشک، پرستار، کارشناس آزمایشگاه، کاردان، بهورز، کارشناس مراقب سلامت و سایر کارکنان که برای اینکار آموزش دیده و تجربه کافی داشته باشند.	پس از گذراندن آموزش تئوری و عملی مرتبط و تأیید صلاحیت توسط مسئول فنی	نمونه گیری طبق دستور العمل مربوطه، بسته بندی و ارجاع

نمونه طبق دستورالعمل انتقال امن و ایمن نمونه.			باشد)		
---	--	--	-------	--	--

ح) استانداردهای فضای فیزیکی و مکان ارائه خدمت:

مطابق با استانداردها و چک لیستهای نظارتی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، آزمایشگاه مرجع سلامت مطابق دستورالعملها و بخشنامه های ابلاغی. آزمایشگاه منتخب تائید تشخیص و کنترل بیماری های متابولیک ارثی

ح) حداقل تجهیزات پزشکی (آزمایشگاهی) سرمایه ای کلیدی به ازای هر خدمت:

ردیف	اقلام سرمایه ای مورد نیاز	تعداد مورد نیاز
۱	دستگاه HPLC	۱
۲	رایانه و پرینتر	۱
۳	یخچال	۱
۴	فریزر -20°C و -70°C	۱
۵	سمپلر در اندازه های مختلف	۱
۶	سانتریفیوژ یخچال دار	۱
۷	شیکر	۱
۸	ورتکس	۱

ط) داروها (معرف ها)، مواد و لوازم مصرفی پزشکی (آزمایشگاهی) کلیدی جهت ارائه خدمت:

ردیف	اقلام مصرفی مورد نیاز	میزان مصرف به ازای هر تست
۱	سرنگ	۱
۲	پد الکلی	۱
۳	چسب	۱
۴	لوله آزمایش	۱
۵	محلول ها و مواد شیمیایی مصرفی برای اندازه گیری کمی آمینواسیدها	به مقدار مورد نیاز

۶	مواد کنترلی (جهت انجام کنترل کیفی آزمایش)	به مقدار مورد نیاز
۷	سرسپلر زرد	۴ عدد به ازای هر نمونه
۸	سرسپلر آبی	۳ عدد به ازای هر نمونه
۹	میکروتیوب 1.5ml	۲ عدد به ازای هر نمونه
۱۰	ویال و Cap	۱ عدد به ازای هر نمونه
۱۱	رک مخصوص حمل و نقل نمونه در حین انجام آزمایش	به تعداد مورد نیاز
۱۲	رک نگهداری نمونه پلاسما در فریزر	به تعداد مورد نیاز
۱۳	دستکش نیتریل	برای هر نفر یک جفت در هر نوبت کاری
۱۴	کاغذ A4	به تعداد مورد نیاز
۱۵	کارت ریج پرینتر	به مقدار مورد نیاز
۱۶	Safety box	به تعداد مورد نیاز

ظ: اقدامات پاراکلینیکی، تصویربرداری و دارویی مورد نیاز قبل از ارائه خدمت:

با توجه به درخواست پزشک

ی) استانداردهای گزارش (شامل مشاهده ها و اندازه گیری های ضروری):

بر اساس دستورالعملها و بخشنامه های ابلاغی.

ل) مدت زمان ارائه هر واحد خدمت:

مدت زمان ارائه این خدمت آزمایشگاهی، از نمونه گیری تا پاسخ دهی حداکثر ۱ هفته می باشد.

ف) موارد ضروری جهت آموزش به بیمار:

رعایت ناشتایی بسته به درخواست پزشک: معمولاً برای نوزاد ۳ الی ۴ ساعت ناشتایی و ۷ سال به بالا بیشتر از ۴ ساعت.

منابع:

- کتاب مرجع نمونه گیری در آزمایشگاه بالینی. از دکتر محمد انصاری، محمدحسام رفیعی، سلاله امام قلی پور، معصومه عزیزی، ستار گرگانی فیروزجانی و ساناز وکیلی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۴.

- کتاب "مجموعه ای از مستندات سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه پزشکی" (آزمایشگاه مرجع سلامت انجمن - آسیب شناسی ایران)، چاپ دوم، سال ۱۳۹۱

• استاندارد INSO-ISO-15189

- دستورالعمل حمل و انتقال نمونه و نگهداری نمونه قبل از آزمایش به شماره سند HD-IMD-00-

MN-WI-003

- Laboratory analysis of amino acids, a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) .,J. Daniel Sharer et al.,2018
- <https://www.mayoclinic.org> (HPLC)
- Laboratory Guide to the methods in Biochemical Genetics (Nenad Blau, book, HPLC)
- Jacques Le Boucher, et al, Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A , Clinical Chemistry 43:8 1421–1428 (1997)