



## عنوان سند:

استانداردهای آزمایش غیر تهاجمی دوران بارداری از نظر ناهنجاری های کروموزومی (NIPT) با استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر (Cell Free Fetal DNA) در آزمایشگاه های تشخیص ژنتیک

## شماره سند:

**HD-GO-00-MN-SD-005-00**

تاریخ	ویرایش	شرح اقدام	تهیه کنندگان	تایید کنندگان	تصویب کننده
۱۳۹۵/۱۲/۴	00	تدوین کلی استاندارد	کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک	اداره ژنتیک وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی	آزمایشگاه مرجع سلامت
			امضا	امضا	امضا
			نام : سمت:	نام : سمت:	نام : سمت:
			امضا	امضا	امضا
			نام : سمت:	نام : سمت:	نام : سمت:
			امضا	امضا	امضا
			نام : سمت:	نام : سمت:	نام : سمت:
			امضا	امضا	امضا

**(۱) هدف از ایجاد:** هدف از تدوین این سند در کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک، تشریح نکات قابل توجه جهت استفاده از آزمایش غیر تهاجمی دوران بارداری از نظر ناهنجاری های کروموزومی (Non Invasive Prenatal Test) با استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر (Cell Free Fetal DNA) در آزمایشگاه های ژنتیک می باشد.

(۱-۱) بازنگری این سند طبق نظر هریک از کارکنان ذیصلاح و با تایید بالاترین مقام ذیصلاح امکان پذیر می باشد.

**(۲) دامنه کاربرد:** کاربرد این استاندارد در کلیه آزمایشگاه هایی است که در چارچوب نظام سلامت، سیستم مدیریت کیفیت بر اساس استاندارد INSO-ISO-15189 را مستقر نموده و توسط مراجع ذیصلاح اعتباربخشی شده اند.

**(۳) منابع:** در تدوین این استاندارد از منابع ذیل استفاده شده است:

۱-۳) استاندارد INSO-ISO-15189

۲-۳) کتاب "مجموعه ای از مستندات سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه پزشکی" (آزمایشگاه مرجع سلامت-انجمن آسیب شناسی ایران)، چاپ دوم، سال ۱۳۹۱.

۳-۳) آیین نامه مستند سازی، شماره گذاری، کنترل مدارک، بازنگری و نحوه صدور به شماره HD-GO-00-MN-RE-001

3-4) Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, Genet Med. 2016 Oct;18(10): -65. doi: 10.1038/gim.2016.97. Epub 2016 Jul 28.

#### (۴) تعاریف:

۱-۴) **روش اجرایی:** سندی که در آن نحوه و چگونگی انجام کار با تعیین مسئولیت های انجام کار شرح داده شده است.

۲-۴) **دستورالعمل کاری:** سندی که در آن جزییات انجام کار به طور دقیق شرح داده شده و جنبه دستور کار را برای مجری دارد.

۳-۴) **آیین نامه:** سندی که ضوابط کلی و مقررات تعیین شده برای موضوعات مختلف سازمانی را مشخص کرده به طوری که در تدوین روش ها و دستورالعمل های کاری این چارچوب ها لازم الاجرا می باشد.

۴-۴) **استانداردهای داخلی:** اسنادی که برای انجام کار در سازمان به صورت قطعی تعیین شده است.

۵-۴) **کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک:** کارگروه ای است که به منظور تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک بر اساس استانداردهای مورد نیاز از سوی وزارت بهداشت با حضور آزمایشگاه مرجع سلامت، اداره ژنتیک، انجمن های ژنتیک و شخصیت های علمی صاحب نظر تشکیل شده و در این سند به اختصار کمیته عنوان می شود.

۶-۴) **NIPT** : Non Invasive Prenatal Test

**۵) شرح سند:** این سند به عنوان یک راهنما جهت تعریف استانداردهای تکنیک NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) در آزمایشگاه هایی که در نظام سلامت، سیستم مدیریت کیفیت مستقر نموده و پس از اعتباربخشی، جهت تشخیص ژنتیک منتخب شده اند کارآیی دارد. روسای آزمایشگاه/ مسئولین فنی هر آزمایشگاه، جهت مدیریت صحیح هر تکنیک لازم است نکات ضروری این تکنیک را با توجه به الزامات فنی استاندارد INSO-ISO-15189 رعایت نمایند. در این قسمت لازم است الزامات فضا، الزامات کارکنان، الزامات تجهیزات، الزامات قبل از آزمایش، حین آزمایش و پس از آزمایش شامل صدور و گزارش نتایج و نحوه حفظ اطلاعات و داده ها مد نظر قرار گیرد.

### ۵-۱) راهنماها و استانداردهای تکنیک NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA)

#### ۵-۱-۱) مرحله درخواست آزمایش (اندیکاسیون در مورد بیماری، کاربرد در مورد تکنیک)

۵-۱-۱-۱) پزشک درخواست کننده تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) بایستی متخصص

زنان-زایمان، پریناتولوژیست، مشاور ژنتیک و یا متخصص ژنتیک پزشکی باشد.

۵-۱-۱-۲) مواردی که درخواست تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) اندیکاسیون دارد:

۱) مشاهده حداقل یک یافته مثبت سونوگرافیک (Soft Marker) به نفع آنومالی های شایع مثل تریزومی های ۱۳ (سندرم پاتو)، ۱۸ (سندرم ادوارد) و ۲۱ (سندرم داون). در چنین مواردی به منظور کاهش نگرانی مادر باردار، کاهش سقط غیرقانونی و یا سقط ناشی از آمنیوسنتز غیرضروری، تست NIPT قابل انجام است.

**تبصره:** Soft Marker ها شامل موارد زیر می باشند که عمدتاً بعد از ۱۸ هفتگی قابل تشخیص می باشند.

- ونتریکولومگالی خفیف ( ۹ تا ۱۱ میلی متر)
- Short Long Bones (FL,HL<5<sup>th</sup> Percentile)
- بینی هیپوپلاستیک(این مورد از بعد از ۱۵ هفتگی قابل تشخیص است).
- NF>6 mm
- Aberrant right subclavian artery
- Echogenic bowel بعد از هفته ۱۸
- هیدرونفروز (Pyelectasia>5 mm) بین هفته ۱۸ تا ۲۰

۲) سابقه تولد نوزاد مبتلا به تریزومی ۱۳ (سندرم پاتو)، ۱۸ (سندرم ادوارد) و ۲۱ (سندرم داون) ( بدون ترانسلوکاسیون).

۳) نتایج مثبت در آزمایش های غربالگری سه ماهه اول و دوم، مشروط بر این که به دلایل موجه پزشکی انجام آمنیوسنتز پس از مشاوره توصیه نشود مانند مسائل زیر:

– مادر با خونریزی(تهدید به سقط)

- مثبت بودن عفونت های ویروسی HIV، HBS و HCV در مادر

- مادر با RH منفی

- حاملگی با استفاده از روش های کمک باروری

۳-۱-۱-۵ مواردی که درخواست تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) اندیکاسیون ندارد:

۱) دوقلویی های دی کوریونی.

۲) چندقلویی.

۳) در مادران با چاقی شدید با  $BMI > 30$  و یا با وزن بالای ۱۰۰ کیلوگرم.

۴) غربالگری آنومالی های کروموزومی غیر از ۱۳، ۱۸ و ۲۱.

۵) در صورتی که نتیجه تست به خاطر Low Fetal Fraction منفی شده است نمونه گیری

مجدد و ارسال نمونه مجدد توصیه نمی شود.

۴-۱-۱-۵ در انجام تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) توجه به موارد زیر ضروری است:

۱. مادر باردار می تواند تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) را به جای

تست های غربالگری معمول انتخاب کند.

۲. تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) به هیچ عنوان جایگزین

تست های تشخیصی برای اثبات بیماری نمی باشد.

۳. مشاوره قبل و بعد از تست الزامی است.

۴. وجود یک نتیجه منفی تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) به معنی

عدم ابتلای قطعی جنین نمی باشد.

۵. نتیجه مثبت تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) باید با آمنیوسنتز

تایید شود.

۶. سن بارداری باید بین ۱۰ تا ۱۶ هفته باشد اما برای سن مادر محدودیتی وجود ندارد.

۷. کلیه درخواست های مربوط به ارسال نمونه جهت تست NIPT (با استفاده از Cell free

Fetal DNA) به خارج از کشور باید با مجوز آزمایشگاه مرجع سلامت بوده و واجد شرایط

مندرج در سند "ضوابط ارسال نمونه های آزمایشگاهی به خارج از کشور" به شماره سند

HD-GO-00-MN-WI-002 باشد.

۵-۱-۱-۵ مادر باردار مراجعه کننده باید قبل از انجام تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA)،

حداقل یک بار سونوگرافی انجام داده باشد که در آن سن بارداری وضعیت تک قلوبی و یا چند قلوبی

جنین ذکر شده باشد و یک کپی از آن را در هنگام پذیرش به آزمایشگاه تحویل داده باشد.

۵-۱-۱-۶) در مواردی که بارداری در ابتدا دوقلوپی بوده اما یک قل از بین رفته است، در زمان نمونه گیری جهت تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA)، باید حداقل ۸ هفته از زمان از بین رفتن آن قل گذشته باشد.

۵-۱-۱-۷) فرد درخواست کننده بایستی آموزش های لازم در حیطه تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA) و نکات مربوط به ویژگی های عملکردی این تست (حساسیت، ویژگی و انواع روش های قابل انجام) را دیده باشد.

تمامی روش ها و انتخاب های موجود دیگر مانند روش های دیگر غربالگری های موجود، آمینوسنتز، CVS و ... به همراه امتیازات و محدودیت های هر روش باید به مراجع کننده توضیح داده شود و مراجعه کننده با آگاهی کافی تصمیم به انجام تست مورد نظر بگیرد.

#### ۵-۱-۲) مرحله پیش از انجام آزمایش

۵-۱-۲-۱) این آزمایش با کد شناسه ۸۱۰۳۲۸ از دفتر تعرفه در آزمایشگاه ژنتیک مورد پذیرش قرار می گیرد.

۵-۱-۲-۲) آزمایشگاه گیرنده نمونه (یا انتقال دهنده نمونه به آزمایشگاه ژنتیک منتخب در کشور) بایستی دارای مسئول فنی ژنتیک با سیستم مدیریت کیفیت بر اساس استاندارد INSO-ISO-15189 باشد.

۵-۱-۲-۳) پرسنل نمونه گیری بایستی آموزش لازم در مورد نحوه کار و اهمیت تست را دیده باشند.

۵-۱-۲-۴) در دستورالعمل پذیرش و نمونه گیری، الزامات مربوط به تست از نظر کدگذاری، نوع نمونه و ... بایستی ذکر شده باشد.

۵-۱-۲-۵) دستورالعمل و شیوه نگهداری نمونه ها و معیارهای رد و قبول نمونه ها می بایست به صورت دستورالعمل مکتوب تهیه و در آزمایشگاه نگهداری گردد به نحوی که در دسترس کارکنان مرتبط قرار داشته باشد و بر رعایت آنها نظارت گردد.

۵-۱-۲-۶) در صورت پذیرش نمونه از مراکز دیگر، آزمایشگاه ارجاع دهنده اولاً می بایست واجد شرایط مندرج در سند "دستورالعمل ارجاع نمونه ها جهت تشخیص بیماری های ژنتیک در نظام سلامت" به شماره HD-GO-00-MN-WI-001 باشد و ثانیاً موظف است روش تهیه، نگهداری و ارسال نمونه را بر طبق دستورالعمل های ابلاغی آزمایشگاه مرجع سلامت رعایت نموده و صحت انجام را به تایید مرکز دریافت کننده برسد.

۵-۱-۲-۷) چنانچه نمونه گیری از خون تام در لوله های ویژه این کار صورت بگیرد می بایست کلیه دستورالعمل های مرتبط جهت حفظ کیفیت نمونه طبق راهنماهای کیت مورد استفاده و شرکت سازنده رعایت گردد. به عنوان مثال در صورت استفاده از لوله های Streck tube، می بایست پس از نمونه گیری ۸-۱۰ بار به صورت آرام سر و ته گردد نمونه گرفته شده در این لوله ها تا ماکزیمم یک هفته قابل

نگهداری در دمای اتاق می باشد، با این حال توصیه می گردد حداکثر تا ۹۶ ساعت بعد از نمونه گیری مراحل جداسازی پلاسما بر روی نمونه ها انجام پذیرد.

۵-۱-۲-۸) آزمایشگاهی که تست را انجام می دهد باید مجهز به تجهیزات مورد نیاز با گواهی صحت گذاری عملکرد و کارکنان مجرب با مدرک مرتبط باشد.

۵-۱-۲-۹) قبل از شروع آزمایش اطلاعات تمامی لوله ها با پرونده بیماران از لحاظ صحت اطلاعات می بایست کنترل شود. تمامی مراحل کنترل باید توسط حداقل دو فرد مستقل انجام پذیرد. سعی شود به منظور کاهش خطای انسانی در اکثر مراحل از دستگاه های بارکد خوان و یا روش های اتوماتیک و مکانیزه استفاده شود.

۵-۱-۲-۱۰) در صورت ارجاع نمونه، آزمایشگاه انجام دهنده آزمون باید ارزیابی شده باشد و همچنین قرارداد همکاری و سوابق ارزیابی آزمایشگاه طرف قرارداد قابل رویت باشد (رعایت کلیه شرایط مندرج در سند "دستورالعمل ارجاع نمونه ها جهت تشخیص بیماری های ژنتیک در نظام سلامت" به شماره HD-GO-00-MN-WI-001 الزامی است).

### ۵-۱-۳) مرحله انجام آزمایش

۵-۱-۳-۱) به دلیل حساسیت بالای تست، توصیه می شود که فضاهای مجزا به مراحل مختلف کار به شرح زیر

اختصاص یابد و تنظیم فشار هوا جهت جلوگیری از وقوع انواع آلودگی ها صورت پذیرد.  
اختصاص چهار فضای اصلی و مجزا به ترتیب زیر برای هر یک از مراحل مختلف آزمایش:

۱. فضای اختصاص یافته به جداسازی پلاسما.

۲. فضای اختصاص یافته به استخراج DNA.

۳. فضای اختصاص یافته به ساخت کتابخانه DNA و سنجش کیفیت.

۴. فضای اختصاص یافته به دستگاه تعیین توالی و متعلقات آن.

هریک از این فضاها باید به شیوه مناسب جدا سازی شده باشد و به طور مناسب با فضای بیرون و مجاور عایق بندی شده باشد.

۵-۱-۳-۲) اتخاذ تمهیدات اساسی و استاندارد جهت جلوگیری از آلودگی نمونه به محصولات PCR و ... الزامی است.

۵-۱-۳-۳) تامین فشار مثبت در بخش های ۱ و ۲ (Pre-PCR) و فشار منفی در بخش های ۳ و ۴ (Post-PCR) و همچنین استفاده از ۲ درب در قسمت ورودی هر بخش که به طور موازی اما در جهت عکس هم دیگر قرار داشته باشند طوری که یک فضای بافر را قبل از ورود به فضای اصلی آزمایشگاه فراهم آورند الزامی است.

- ۴-۳-۱-۵ روند انجام کار همواره از بخش ۱ به بخش ۴ به صورت یک سویه است (Unidirectional) و هیچیک از مواد و تجهیزات نباید به اتاق قبل منتقل گردد.
- ۵-۳-۱-۵ عدم استفاده مشترک از ابزارها مابین بخش های چهارگانه و استفاده پرسنل از پوشش های مخصوص هر بخش از جمله روپوش، کلاه، عینک، ماسک، دستکش و روکفشی به صورت جداگانه در هر بخش الزامی می باشد.
- ۶-۳-۱-۵ ابعاد فضاهای اختصاص داده شده به هر بخش باید از لحاظ ارگونومیک، نور، دما و صدا، شرایط مطلوب کار را برای دستگاههای حساسی که در این بخش ها استفاده می گردند فراهم آورد.
- ۷-۳-۱-۵ فضای مناسب برای نگهداری و انبار برخی لوازم مصرفی باید پیش بینی شده باشد.
- ۸-۳-۱-۵ لامپ UV با رعایت فاصله استاندارد در بخش های ۱-۳ باید تعبیه گردد.
- ۹-۳-۱-۵ امکان تنظیم دما و رطوبت باید به طور مستقل برای هر یک از فضاهای چهارگانه وجود داشته باشد.
- ۱۰-۳-۱-۵ امکانات و تدابیر دفع پسماندها و مواد مصرف شده در هر فضا باید به نحوی پیش بینی شود که احتمال انتشار آلودگی به حداقل برسد.
- ۱۱-۳-۱-۵ گزارش کار برای تمامی آزمایشات و هر مرحله از آنها با تکیه بر تمامی جزییات مانند نام نمونه، فرد انجام دهنده، زمان انجام آزمایش، دستگاه و وسیله مورد استفاده، مقادیر مورد استفاده و ... باید به صورت مستند ثبت گردد.
- ۱۲-۳-۱-۵ کلیه نتایج مربوط به آزمایش ها به همراه تصاویر و اسناد مربوط به نتایج آن ها و نیز نسخه ای از گزارش نتایج باید برای مدت حداقل یک سال پس از به دنیا آمدن نوزاد در آزمایشگاه بایگانی گردد.
- ۱۳-۳-۱-۵ مقدار کافی از نمونه پلاسمای جدا شده از تمامی نمونه ها پس از انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد برای مدت حداقل یک سال پس از تولد نوزاد باید نگهداری گردد.
- ۱۴-۳-۱-۵ نمونه خون مادر باقی مانده پس از جداسازی پلاسمای آن تا مدت حداقل یک سال پس از تولد نوزاد باید نگهداری گردد.
- ۱۵-۳-۱-۵ نمونه DNA استخراج شده از پلاسمای تا مدت حداقل یک سال پس از تولد نوزاد باید نگهداری گردد.
- ۱۶-۳-۱-۵ توصیه می شود نمونه گیری کشت میکروبی از محیط آزمایشگاه به منظور جلوگیری از آلودگی های DNA با منشا خارجی، دست کم هر ۲ ماه یک بار صورت بگیرد.
- ۱۷-۳-۱-۵ به منظور انجام کنترل کیفی خارجی هر ۳ ماه یک بار ارسال حداقل یک نمونه و آنالیز مستقل آن توسط آزمایشگاه یا مرکز مرجع و یا آزمایشگاه همکار مستقل پیشنهاد می گردد.
- ۱۸-۳-۱-۵ در ابتدای راه اندازی آزمایشگاه باید از دستگاه ها و محل های مختص انجام آزمایش نمونه گیری شود و عدم وجود آلودگی DNA در آنها با روش های سنجشی مناسب (مانند استفاده از دستگاه بیوانالیزر و ...) چک گردد. این سنجش باید به صورت ادواری (هر سه ماه یک بار) تکرار گردد و مستندات آن نگهداری شود. پیشنهاد می گردد نمونه گیری از موارد زیر صورت پذیرد:

• **هوا:** به طوری که یک میکروتیوب حاوی ۲۰۰ میکرو لیتر آب استریل را به صورت در باز و به مدت ۲ ساعت در حین انجام آزمایش و یا به مدت ۸ ساعت قبل از انجام آزمایش روی میز قرار دهید.

• **سطوح:** تمامی سطوح کاری بخش ها

• **تجهیزات:** سطح تمامی سمپلرها و دستگاه ها

• **سانتریفوژها:** به صورتی که حداقل از داخل ۸ خانه هر سانتریفوژ نمونه گیری شود.

#### ۵-۱-۴) مرحله پس از انجام آزمایش (تفسیر آزمایشگاهی و تهیه گزارش - مستندات مورد نیاز)

۵-۱-۴-۱) درصد DNA جنینی در جواب ارایه شده باید ذکر شده باشد.

۵-۱-۴-۲) حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) روش باید در برگه جواب ذکر گردد.

۵-۱-۴-۳) در جواب ارایه شده می بایست روش انجام آزمایش و پلت فرم مورد استفاده ذکر گردد.

۵-۱-۴-۴) آزمایشگاه ارائه دهنده این تست باید امکانات انجام تست های تاییدی بعدی مانند بررسی QF PCR، MLPA، FISH و یا کاریوتایپ را بر روی نمونه مایع آمنیوتیک و یا CVS را داشته باشد و یا با آزمایشگاه های واجد شرایط قرارداد داشته باشد.

۵-۱-۴-۵) آزمایشگاه باید کلیه اطلاعات، محاسبات و هرگونه سندی که منجر به تفسیر و نتیجه نهایی می گردد را برای مدت حداقل دو سال حفظ نماید (قویا توصیه می شود با استفاده از امکانات نرم افزاری ظرفیت نگهداری سوابق به صورت نامحدود افزایش یابد).

#### ۵-۱-۵) مرحله تفسیر بالینی

۵-۱-۵-۱) آزمایشگاه انجام دهنده تست باید دارای مسئول فنی با تخصص ژنتیک پزشکی و یا انسانی باشد

که ضمن نظارت بر راه اندازی و حسن انجام آزمایش، تفسیر دقیق نتایج حاصل از تست را به پزشک معالج یا مراجعه کننده، ارایه دهد.

۵-۱-۵-۲) جواب تست NIPT (با استفاده از Cell free Fetal DNA)، باید توسط مسئول فنی ژنتیک امضاء شود.

۶) **مستندات:** ندارد.