تهیه کنندگان:
حسین عبادی فرد، مجتبی خشوعی پاریزی،
علی خوش نژاد، مریم هدایتی یگانه
اداره امور آزمایشگاه های دانشگاه علوم پزشکی قم
آزمایشگاه مرجع دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی قم

تضمین کیفیت تجهیزات بخش مولکولی

مجموعه فعالیت‌های لازم برای اطمینان از برخورداری آزمایش از کیفیت قابل قبول را تضمین کیفیت می‌گویند. برای رسیدن به این هدف برقراری برنامه‌های کنترل کیفیت (Quality Control) در آزمایشگاه‌ها الزامی است بالأخص در آزمایشگاه‌های مولکولی و ژنتیک. دلیل اهمیت اجرای برنامه‌های کنترل کیفی در آزمایشگاه‌های مولکولی این است که هر بیمار یک بار به آزمایشگاه مولکولی و ژنتیک مراجعه می‌کند و جواب داده شده تغییر نخواهد کرد و در صورت وجود هرگونه خطا در گزارش جواب، اطلاعات نادرست در ارتباط با ژنتیک فرد ارائه شده که در تمام عمر همراهش است. از طرف دیگر در برخی تست‌های ژنتیکی، جواب آزمایش فرد را می‌توان به ژنتیک کل خانواده تعمیم داد، لذا صحت جواب بسیار اهمیت دارد. علاوه بر این، پزشکان و متخصصان نیز به دلیل اعتماد بالایی که به تست‌های ژنتیکی دارند بدون بررسی صحت انجام آزمایش‌ها با دریافت نتایج برای بیمار تصمیم‌گیری می‌کنند، از این رو مسئولیت صحت جواب‌ها با آزمایشگاه مربوطه است؛ لذا اجرا برنامه‌های کنترل کیفی در تست‌های مولکولی و ژنتیک بیش از سایر بخش‌های آزمایشگاه اهمیت دارد. اما به دلیل وجود فناوری‌های جدید و پیشرفت سریع این تکنیک‌ها، انتظارات بالا از صحت تست ژنتیکی، عدم وجود مواد تضمین‌کننده‌ی کیفیت نظیر مواد و روش‌های از بین برنده آلودگی‌های ممکن در تست‌های مولکولی و کم بودن خروجی‌های کمی، اجرای برنامه‌های کنترل کیفی در بخش مولکولی آزمایشگاه‌های دنیا به‌خصوص کشور ما همیشه با مشکل روبه‌رو بوده است؛ لذا در این مقاله به تعریف و توضیح برخی از نکات مربوط به کنترل کیفی در بخش مولکولی و ژنتیک پرداخته شده است.

همانند سایر آزمایش‌های پزشکی، آزمایشگاه‌هایی که آزمایش‌های مولکولی انجام می‌دهند، باید از روش‌های معتبر اعتبارسنجی پیروی کنند تا نتایجی با اعتبار و صحت تولید شود.

آزمایشگاه‌هایی که این برنامه‌ها را در مراکز خود پیاده می‌کنند می‌توانند همیشه به جواب‌های خود مطمئن بوده و با ارائه مستندات حاصله، این اطمینان خاطر را برای بیماران و پزشکان ایجاد کنند.

روند بررسی کیفیت تجهیزات شامل آموزش و ملزومات کالیبراسیون اولیه است که توسط شرکت سازنده پشتیبانی می شود. بررسی کیفیت تجهیزات در آزمایشگاه مولکولی اغلب در فرایند صحه گذاری و تصدیق روش های آزمایشگاهی پوشش داده می شود. برای شایع ترین تجهیزات مولکولی مثل پیپت و میکروسانتریفیوژ پیروی از توصیه شرکت سازنده ضروری است. تجهیزات تخصصی مولکولی مثل ترمال سایکلرها گستره کاربردی وسیعی دارند و می توانند با انواع پروتکل های استخراج ، کیت ها و تست های متفاوت به کاربرده شوند ، در این موارد توصیه می شود آزمایشگاه معیار کفایت دستگاه را با توجه به مشخصات و توصیه های شرکت سازنده ، مقاصد کاربردی آزمایشگاه و الزامات قانونی مشخص کند. تمامی وسائل و تجهیزات باید کالیبره شده باشند و اطلاعات مربوطه به زمان کالیبراسیون روی آن ها ثبت شده باشد. هر دستگاهی که برای تعمیر فرستاده می شود بعد از بازگشت باید مجددا کالیبر شده و صحت عملکرد آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

تضمین کیفیت در بخش پاتولوژی مولکولی

۱- ارزیابی کیفیت داخلی: پایش تمام فرایند های آزمایشگاه از دریافت نمونه تا گزارش نتیجه شامل موارد زیر انجام می گردد :

۱-۱-تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نوع نمونه مورد نیاز،

زمان گرفتن نمونه، جزئیات حمل نمونه و تائید هویت بیمار (نمونه باید از حجم کافی برخوردار باشد، تمام اطلاعات لازم برای انجام تست را داشته باشد، زمان جمع آوری نمونه روی آن نوشته شده باشد و نحوه نگهداری نمونه باید بررسی شود).

۲-۱- تعیین معیارهای رد نمونه (مانند موارد مشکوک به آلودگی ، وجود شواهد همولیز نمونه هپارینه و ...) و نظارت بر اجرای آن ها

۳-۱-تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نحوه نگهداری نمونه ها و مواد (نگهداری نمونه های DNA و الیگونوکلئوتیدها در دمای ۲۰- تا۸۰- درجه و در بافر TE و یا در آب با درجه مولکولار ، نگهداری محصولات PCR نیز در۲۰- تا ۸۰ - درجه سانتیگراد نگهداری و نمونه های حاوی RNA حتما در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد

۴-۱-تهیه دستورالعمل نحوه ارجاع صحیح و ایمن نمونه ها در صورت نیاز به ارجاع

۵-۱-ثبت اطلاعات مربوط به درخواست تست مورد نظر در سیستم اطلاعات آزمایشگاه هنگام ورود نمونه به آزمایشگاه و انجام فرایند بر اساس گردش کار و SOP مربوطه

۶-۱-تهیه دستورالعمل صحیح انجام آزمایش های مختلف

۷-۱-استفاده از نمونه های تضمین کننده کنترل کیفی داخلی IQA برای پایش و بررسی خطا و در گردش کاری آزمایشگاه ملکول، به این صورت که به صورت تصادفی ۵-۳٪ از نمونه های بالینی آزمایشگاه انتخاب شده(رویکرد Split sampling) و مجددا آزمایش می شوند. در صورت وجود هرگونه تفاوت بین دو نتیجه هر نمونه بایستی بررسی و اقدامات اصلاحی انجام شود.

نکته : در مواردی که فراوانی انجام یک تست خاص پایین است و رویکرد Split sampling کارایی ندارد آزمایشگاه می تواند از یک نمونه بالینی که قبلا آزمایش شده و خصوصیات آن تایید شده است یا ازنمونه های ریز افزوده شده (split) یا موارد موجود درپنل کنترل کیفی خارجی نیز استفاده کند.

۲-کنترل کیفی داخلی:

۱- ۲- استفاده از کنترل های داخلی موجود درکیت های تجاری در هر سری کاری به منظور تایید نتایج حاصل از انجام آزمایش

۲-۲- در موارد ی که تست توسط آزمایشگاه طراحی شده است آزمایشگاه بایستی برنامه کنترل کیفی داخلی را تعیین و محدوده آن را مشخص کند.

۳-۲-صرف نظر از اینکه تست با کیت تجاری انجام می شود یا اینکه در آزمایشگاه طراحی شده است؛ بهتر است موارد کنترل خارجی (Run controls External) در هر سری کار گنجانده شود تا امکان بررسی توافق عملکرد بین سری های ساخت (Batch) متفاوت مربوط به کیت های یک قسمت و واکنشگر های آن و رانش (Drift) و رانش بالقوه یک سنجش را فراهم سازد.

۳-ارزیابی خارجی کیفیت(EQA)

شرکت در برنامه های ارزیابی کیفیت خارجی به صورت دوره ای در طول سال

کنترل کیفیت و نگهداری تجهیزات

روند بررسی تجهیزات شامل آموزش و کالیبراسیون اولیه که توسط شرکت سازنده پشتیبانی می شود. بررسی کیفیت تجهیزات آزمایشگاه مولکولار اغلب در فرایند صحه گذاری و تصدیق روشهای آزمایشگاهی پوشش داده می شود. برای شایعترین تجهیزات مولکولی مثل پیپت و میکرو سانتریفیوژ پیروی از توصیه شرکت سازنده ضروری است. تجهیزات تخصصی مولکولی مثل ترمال سایکلر گستره کاربردی وسیعی دارند و می توانند با انواع پروتکل های استخراج ، کیت ها و تست های متفاوت به کار برده شوند. در این موارد توصیه می شود آزمایشگاه معیار کفایت دستگاه را با توجه به مشخصات و توصیه های شرکت سازننده ، مقاصد کاربردی آزمایشگاه و الزامات قانونی مشخص کند. تمامی وسایل و تجهیزات باید کالیبره شده باشند و اطلاعات مربوط به زمان کالیبراسیون روی آن ثبت شده باشد. هر دستگاهی که برای تعمیر فرستاده می شود بعد از بازگشت باید مجددا کالیبره شود.

ترمال سایکلر

۱- نگهداری:

۱-۱- بازبینی چاهک ها پیش از شروع استفاده از تجهیز برای اطمینان از عدم آلودگی و اجسام خارجی

۲-۱- تمیز کردن بلوک ها، چاهک ها، سینی ها و پوشش حرارتی با استفاده از محلول آب ژاول ۱۰٪ و سواپ و سپس استفاده از الکل ۷۰٪ برای تمیز کردن هیپوکلریت سدیم باقی مانده

۲-کالیبراسیون و کنترل کیفیت :

۱-۲- کنترل خصوصیاتی که بر نتیجه PCR اثر می گذارد از جمله صحت، یکنواختی دمایی ، خارج شدن دما بالاتر یا پایین تر از حد تنظیم شده (OverShooting/UnderShooting)، سرعت تغیر دما و Hold Time. از حد خارج شدگی دمایی در فاز Platue نباید از ۵ درجه سانتی گراد بیشتر و مدت آن نباید از ۱۰ ثانیه بیشتر شود.

نکته :

کنترل از حد خارج شدن دمایی در ترمال سایکلر های سریع به دلیل شایع تر بودن این امر اهمیت بیشتری دارد.

۲-۲-آزمون صحه گذاری کالیبراسیون دمایی (Tempe Calibration Verification Test ration): با استفاده از کیت سامانه صحه گذاری دما Calibration System Tempe ration بر اساس دفترچه راهنمای سازنده تجهیز انجام می شود.

۳-۲- آزمون نایکنواختی دما: بین چاهک ها با استفاده از دماسنج دیجیتال بر اساس دفترچه تجهیز و تماس با شرکت مربوطه در صورت عدم تطابق با مشخصات ذکر شده توسط شرکت.

توجه در آزمایشگاه مولکولی ۲ نوع ترمال سایکلر وجود دارد:

۱– نوع End Point که دمای آن باید ۲ بار در سال چک شود.

۲- نوع Q PCR که بایستی کالیبراسیون زمینه ماهیانه، بررسی طول موج دو بار در سال و Verification Run RNase سالیانه انجام شود.

PCR Real Time کمی

۱- نگهداری :

۱-۱-بازبینی چاهک ها از نظر عدم آلودگی و اجسام خارجی و تمیز نمودن تجهیز مانند شرایط ذکر شده در مورد نگهداری تجهیز ترمال سایکلر

۲-۱-بررسی حجم و فضای باقی مانده حافظه سامانه در فواصل منظم

۳-۱-بازبینی و یا تعویض لامپ هالوژن و یا فیوزها در موارد لزوم طبق توصیه سازنده

۲- کالیبراسیون :

شامل کالیبراسیون ROI یا نقاط مورد نظر ، کالیبراسیون زمینه، کالیبراسیون رنگ خاص و در صورت لزوم کالیبراسیون نوری با توجه به توصیه شرکت سازنده قید شده در دفترچه راهنما هر تجهیز با در نظر گرفتن تعداد آزمایش های درخواستی در ماه انجام می شود.

۳- کنترل کیفیت :

۱-۳-بررسی کیفیت RNA یا DNA استخراج شده (اطمینان از یکپارچگی اسید نوکلئیک و عدم وجود مهار کننده ها) و کارآمدی PCR با استفاده از کنترل های مثبت و منفی ، کنترل داخلی و استانداردها

- تمام نمونه های کنترل منفی باید در زیر حد آستانه (Threshold) پیک بدهند.
- باید تمام نمونه های مثبت پیک را در CT کمتر از ۳۳ بدهند.
- باید نمونه های کنترل داخلی CT بین ۲۷ تا ۳۳ بدهند.

۲-۳- اطمینان از یکنواختی دما و سامانه نوری در سرتاسر بلوک با استفاده از برنامه اجرایی مشخص مطابق دفترچه راهنما هر تجهیز مانند توزیع و واکنش گرها و مواد لازم برای PCR در تمام چاهک ها و مشخص کردن موارد عدم انطباق در نتیجه ها با محاسبه انحراف معیار ، بازه inter-Quartile و حداکثر اختلاف CT در سرتاسر بلوک.

۳-۳- تعیین قدرت تفکیک با محاسبه حداقل تفاوت چند برابر شدن تعداد نسخه ای که توسط تجهیز قابل شناسایی است.

سامانه مستندسازی ژل (Gel Doc)

۱- نگهداری:

۱- ۱- تمیز کر د ن تجهیزات با دستمال مرطوب و درصورت آلودگی،آغشته کردن دستمال با مقداری اتانول

۲-۱- عدم استفاده از ایزوپروپانول روی شیشه فیلتر فرابنفش به علت امکان خوردگی

۳-۱- دوری از قرار دادن اجسام تیز روی شیشه فیلتر به علت امکان آسیب عبور دهنده نور و عدم یکنواختی مواجهه فرابنفش

۴-۱- رعایت دما و رطوبت مطلوب محیط برای کارکرد بهینه تجهیز بر اساس دفترچه

کنترل کیفیت

درخواست از شرکت پشتیبان برای بررسی و اعمال تنظیمات مربوط به کنترل کیفی شامل: کنترل کیفیت تابش، مواجهه و تصویر که معمولا توسط کاربر عادی قابل انجام نیست و باید توسط کارشناس فنی انجام شود.

هود

در آزمایشگاه مولکولی ۲ نوع هود وجود دارد :

۱- هود بیولوژیک

۲- هود Work Station (محل انجام PCR از قبیل آماده سازی نمونه)

کارایی هود ها باید سالیانه توسط یک فرد ماهر چک شود و مهر کنترل کیفی زده شود در هنگام استفاده از هودهای Biosafety دقت شود که Gaugeهای فشار عدد نزدیک به عدد کالیبره باشد این فشار میزان کارایی هود را تایید می کند افزایش قابل توجه در آن نشان دهنده کثیف شدن فیلتر هاست و کاهش زیاد فشار نشان دهنده یک اختلال الکتریکی است؛ اما هود work station بیشتر باید از نظر ضدعفونی و عاری از میکروب بودن چک شود. هر دو ماه باید از نظر سطح موجود در هودها با سواپ نمونه گیری شود و از لحاظ آلودگی بررسی شوند.

استاندارد کارایی مطلوب لامپ UV ۲۰۰۰ ساعت و فیلتر هپا ۳۰۰۰ ساعت تعیین شده است که بعد از این مدت باید تعویض شود.

سانتریفیوژ

سانتریفیوژ برای مراحل Pre PCR و Post PCR باید جدا باشد. سانتریفیوژها باید طبق دستورالعمل ذکر شده در منابع کنترل کیفی تجهیزات کنترل کیفی و کالیبره شوند و قبل از هر بار استفاده بالانس شوند.

باتوجه به اهمیت صحت عملکردی سانتریفیوژ و دور بالا در فرایند های استخراج مخصوصا Absorption Chromatography، دربخش مولکولار بررسی دور با تاکومتر بایستی به صورت ماهانه انجام شود.

تجهیزات برودتی و حرارتی

کنترل دمای تجهیزات روزانه ۳-۲ بار با ترمومتر کالیبره صورت پذیرد. حداکثر اختلاف دمای قابل قبول با دمای هدف مذکور در دفترچه راهنما برای انکوباتور ها ، حمام آب و بلوک های گرم کننده (Heating Block) ۰٫۵ ± درجه است.

- دمای یخچال ها بایستی بین ۵-۱ درجه سانتیگراد باشد.
- دمای فریزرها بین ۲۵- تا ۱۵- درجه سانتیگراد باشد.
- فریزر های فوق خنک کننده بین ۸۰- تا ۶۰- درجه سانتیگراد باشند.
- دمای وسایل باید حداقل یک بار در روز چک شود.
- یخچال حاوی Reagent باید از یخچال حاوی نمونه ها و محصولات PCR جدا باشد.

پیپت

- به دلیل حساسیت بالای تست بهتر است از هر دو نوع پیپت با حجم ثابت و قابل تغییر استفاده شود.
- کالیبراسیون و کنترل کیفی پیپت ها باید براساس دستورالعمل تجهیزات حجمی موجود انجام شود.
- پیپت ها باید براساس راهنمای سازنده استریلیزه شوند (به صورت دوره ای).