

نویسندگان:

مجتبی خشوعی یاریزی، مریم هدایتی یگانه
شرکت کنترل کیفیت سفیرسبز

تضمین کیفیت تجهیزات بخش مولکولی آزمایشگاه

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 می‌شود. بررسی کیفیت تجهیزات در آزمایشگاه مولکولی اغلب در فرایند صحنه گذاری و تصدیق روش های آزمایشگاهی پوشش داده می‌شود. برای شایع ترین تجهیزات مولکولی مثل پیت و میکروسانتریفیوژ، پیروی از توصیه شرکت سازنده ضروری است. تجهیزات تخصصی مولکولی مثل ترمال سایکلرها، گستره کاربردی وسیعی دارد و می‌تواند با انواع پروتکل های استخراج، کیت ها و تست های متفاوت به کار برده شوند ، در این موارد توصیه می‌شود 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 می‌شود بعد از بازگشت باید مجدداً کالیبره شده و صحت عملکرد آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

تضمین کیفیت در بخش پاتولوژی مولکولی

۱- ارزیابی کیفیت داخلی: پایش تمام فرایندهای آزمایشگاه از دریافت نمونه تا گزارش نتیجه شامل موارد زیر انجام می‌شود:

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 بخصوص 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 اجرای 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 به خصوص 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.

۱-۱- تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نوع نمونه مورد نیاز، زمان گرفتن نمونه، جزئیات حمل نمونه و تأیید 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).

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

۱-۳- تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نحوه نگهداری نمونه‌ها و مواد (نگهداری نمونه‌های DNA و الیگونوکلوئوتیدها در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه و در بافر TE و یا در آب با درجه مولکولار، نگهداری محصولات PCR نیز در ۲۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری و نمونه‌های حاوی RNA حتما در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد).

۱-۴- تهیه دستورالعمل نحوه ارجاع صحیح و ایمن نمونه‌ها در صورت نیاز به ارجاع.

۱-۵- 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.

۱-۶- تهیه دستورالعمل صحیح انجام آزمایش‌های مختلف.

۱-۷- استفاده از نمونه‌های تضمین کننده کنترل کیفی داخلی IQA برای پایش و بررسی خطا و در گردش کاری آزمایشگاه مولکولی، به این صورت که به صورت تصادفی ۳-۵٪ از نمونه‌های بالینی آزمایشگاه انتخاب شده (رویکرد Split sampling) و مجدداً آزمایش می‌شود. 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 می‌تواند از یک نمونه بالینی که قبلاً آزمایش شده و خصوصیات آن تأیید شده است یا از نمونه‌های ریز افزوده شده (split) یا موارد موجود در پنل کنترل کیفی خارجی نیز استفاده کند.

۲- کنترل کیفی داخلی:

۲-۱- استفاده از کنترل‌های داخلی موجود در کیت‌های تجاری در هر سری کاری به منظور تأیید نتایج حاصل از انجام آزمایش.

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

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

۳- ارزیابی خارجی کیفیت (EQA)

شرکت در برنامه‌های ارزیابی کیفیت خارجی به صورت دوره‌ای در طول سال

کنترل کیفیت و نگهداری تجهیزات

روند بررسی تجهیزات شامل آموزش و کالیبراسیون اولیه که توسط شرکت سازنده پشتیبانی می‌شود. بررسی کیفیت تجهیزات آزمایشگاه مولکولار، اغلب در فرایند صحت‌گذاری و تصدیق روش‌های آزمایشگاهی پوشش داده می‌شود. برای شایع‌ترین تجهیزات مولکولی مثل پیمپت و میکرو سانتریفیوژ پیروی از توصیه شرکت سازنده ضروری است. تجهیزات تخصصی مولکولی مثل ترمال سایکلر، گستره کاربردی وسیعی دارد و می‌تواند با انواع پروتکل‌های استخراج، کیت‌ها و تست‌های متفاوت به کار برده شود. در این موارد توصیه می‌شود آزمایشگاه معیار کفایت دستگاه را با توجه به مشخصات و توصیه‌های شرکت سازنده، مقاصد کاربردی آزمایشگاه و الزامات قانونی مشخص کند. تمامی وسایل و تجهیزات باید کالیبره شده باشد و اطلاعات مربوط به زمان کالیبراسیون روی آن ثبت شده باشد. هر دستگاهی که برای تعمیر فرستاده می‌شود بعد از بازگشت باید مجدداً کالیبره شود.

ترمال سایکلر

۱- نگهداری:

۱-۱- بازبینی چاهک‌ها پیش از شروع استفاده از تجهیز برای اطمینان از عدم آلودگی و اجسام خارجی.

۱-۲- تمیز کردن بلوک‌ها، چاهک‌ها، سینی‌ها و پوشش

PCR Real Time کمی

۱- نگهداری:

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

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

۱-۳- 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 راهنمای هر تجهیز با در نظر گرفتن تعداد آزمایش‌های درخواستی در ماه انجام می‌شود.



۳- کنترل کیفیت:

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

- تمام نمونه‌های کنترل منفی باید در زیر حد آستانه (Threshold) پیک بدهند.

- باید تمام نمونه‌های مثبت پیک را در CT کمتر از ۳۳ بدهند.

- باید نمونه‌های کنترل داخلی CT بین ۲۷ تا ۳۳ بدهند.

۳-۲- اطمینان از یکنواختی دما و سامانه نوری در سرتاسر بلوک با استفاده از برنامه اجرایی مشخص مطابق دفترچه



حرارتی با استفاده از محلول آب ژاول ۱۰٪ و سواپ و سپس استفاده از الکل ۷۰٪ برای تمیز کردن هیپوکلریت سدیم باقیمانده.

۲- کالیبراسیون و کنترل کیفیت:

۲-۱- کنترل خصوصیات که بر نتیجه PCR اثر می‌گذارد از جمله صحت، یکنواختی دمایی، خارج شدن دما بالاتر یا پایین تر از حد تنظیم شده (Over Shooting/Under Shooting)، سرعت تغییر 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 سایکلرهای سریع، به دلیل شایع تر بودن این امر اهمیت بیشتری دارد.

۲-۲- آزمون صحت گذاری کالیبراسیون دمایی (Tempe ration Calibration Verification Test):

با استفاده از کیت سامانه صحت گذاری دما Tempe ration Calibration System براساس دفترچه راهنمای سازنده تجهیز انجام می‌شود.

۲-۳- آزمون نایکناختی دما: بین چاهک‌ها 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 داشته باشید 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 RNase Verification Run سالانه 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 هودها باید سالیانه توسط یک فرد ماهر چک شود و مهر کنترل کیفی زده شود. در هنگام استفاده از هودهای Biosafety دقت شود که Gauge های فشار، عدد نزدیک به عدد کالیبره باشد. این فشار میزان کارایی هود را تأیید 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 ضد عفونی 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 شود. استاندارد کارایی مطلوب لامپ UV، ۲۰۰۰ ساعت و فیلترها 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 شود و قبل از هر بار استفاده بالانس شود. باتوجه به اهمیت صحت عملکردی سانتریفیوژ و دور بالا در فرایندهای استخراج مخصوصاً Absorption Chromatography، در بخش مولکولار بررسی دور با تاکومتر بایستی به صورت ماهانه انجام شود.



راهنما هر تجهیز مانند توزیع و واکنش گرما 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 کردن تجهیزات با دستمال مرطوب و در صورت آلودگی، آغشته کردن دستمال با مقداری اتانول.
- ۱-۲- عدم استفاده از ایزوپروپانول روی شیشه فیلتر فرابنفش به علت امکان خوردگی.
- ۱-۳- دوری از قراردادن اجسام تیز روی شیشه فیلتر به علت امکان آسیب عبور دهنده نور و عدم یکنواختی مواجهه فرابنفش.
- ۱-۴- رعایت دما و رطوبت مطلوب محیط برای کارکرد بهینه تجهیز بر اساس دفترچه.

۲- کنترل کیفیت:

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



- فریزرهای فوق خنک کننده، بین ۶۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد باشند.
- دمای وسایل باید حداقل یک بار در روز کنترل شود.
- یخچال حاوی Reagent باید از یخچال حاوی نمونه‌ها و محصولات PCR جدا باشد.



پیپت

- به دلیل حساسیت بالای تست، بهتراست ازهر دونوع پیپت با حجم ثابت و قابل تغییر استفاده شود.
- کالیبراسیون و کنترل کیفی پیپت‌ها باید براساس دستورالعمل تجهیزات حجمی موجود انجام شود.
- پیپت‌ها باید براساس راهنمای سازنده ضدعفونی شود (به صورت دوره ای).

تجهیزات برودتی و حرارتی

- کنترل دمای تجهیزات روزانه ۲ تا ۳ بار با ترمومتر کالیبره صورت پذیرد. حداکثر اختلاف دمای قابل قبول با دمای هدف مذکور در دفترچه راهنما برای انکوباتورها، حمام آب و بلوک‌های گرم کننده (Heating Block) $+0.5$ درجه است.
- دمای یخچال‌ها بایستی بین ۱-۵ درجه سانتیگراد باشد.
- دمای فریزرها بین ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد باشد.

فرم اشتراک ماهنامه **مستقبل پزشکی**

نام و نام خانوادگی: رشته/تخصص: کد ملی:
 نام محل کار: مسئولیت:
 نشانی:
 کدپستی: تلفن: فاکس:
 موبایل: ایمیل:

♦ تکمیل تمام موارد فوق الزامی است ♦

(تهران)	(پشت پیشتاز)	(شهرستان)
اشتراک ۶ ماهه ۹۰,۰۰۰ تومان	اشتراک ۶ ماهه ۱,۰۵۰,۰۰۰ تومان	
اشتراک یکساله ۱,۸۰۰,۰۰۰ تومان	اشتراک یکساله ۲,۱۰۰,۰۰۰ تومان	

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۵۰۰ دلار است.
 لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر واتس‌آپ نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۷۲۲۴-۸۲۸۷-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۸۴۲۳۴-۱۲۰۸۴۲۳۴-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی
 ایمیل: matashkhis@gmail.com / واتس‌آپ: ۰۹۱۲۷۳۳۳۴۰۷-۰۸۶۰۹۳۱۰۸-۲۱۸۸۹۸۷۵۰۱-۸۶۰۹۳۱۰۸-۲۱۸۸۹۸۷۵۰۱