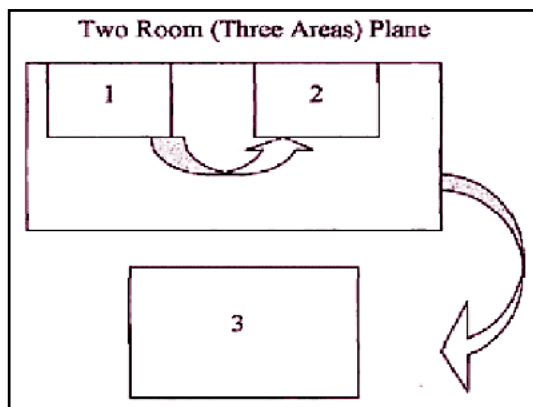


مروری بر راهنمای عملکرد مطلوب در آزمایشگاه تشخیص مولکولی

جهت جلوگیری از انتقال آلودگی، رعایت گردش کار یک سویه ضروری است که این به معنای عدم انتقال مواد و تجهیزات از اتاق‌های دیگر، عدم استفاده مشترک از ابزارها و اجتناب از رفت و آمد غیرضروری و مکرر بین اتاق‌ها است. همچنین روپوش مخصوص برای هر اتاق باید تأمین گردد و قبل از خروج تعویض گردد. از آنجا که از ابتدا دریافت نمونه، آماده‌سازی اولیه، استخراج اسید نوکلئیک، تهیه مخلوط واکنشی و افزودن مواد ژنتیکی حاصل از تخلیص به لوله آزمایش نیازمند مراحل گوناگونی است، توصیه می‌شود برای هر یک از مراحل، ست کاری مستقل شامل اتاقک کاری (WORK STATION) سمپلرهای متغیر، سرسمپلر، لوله‌های آزمایش، دستکش‌های یکبار مصرف لاتکس فاقد پودر و لوله‌های آزمایش مناسب اختصاص داده شود.

* فضاهای کار در آزمایشگاه تشخیص مولکولی که گردش کار یک سویه در آن رعایت شده مدیریت انبارش و نگهداری نمونه‌ها و مواد: برای نگهداری نمونه‌ها قبل و بعد از تخلیص، حداقل به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نیاز است. تعداد و حجم فریزر باید متناسب با حجم کار و طراحی



این مقاله مروری بر راهنمای یک آزمایشگاه تشخیص مولکولی است. با هدف رعایت سنجه‌های چک لیست مولکولی (فضا و تجهیزات، وضعیت ایمنی زیستی، فرایندهای قبل، حین و پس از آزمایش، نحوه کنترل کیفی، اصول نگهداری تجهیزات و ...) تا نتیجه خروجی کار آزمایشگاه مطلوب باشد. کاربرد آزمایشگاه تشخیص مولکولی با هدف تشخیص صحیح بیماری و جلوگیری از خطاهای احتمالی، ناشی از وقوع انواع آلودگی به علت حساسیت روش نیاز به رعایت الزامات درجبه‌های مختلف است.

فضا و تأسیسات: بخش تشخیص مولکولی باید از سایر واحدهای آزمایشگاهی جدا و ایزوله در نظر گرفته شود. در فضاسازی واحد تشخیص مولکولی، مهم‌ترین موضوع جداسازی محل تخلیص و نگهداری نمونه‌ها، محل نگهداری و تهیه معرف‌های واکنش و افزودن اسید نوکلئیک به معرف‌های واکنش (Pre PCR) و محل انجام تکثیر و مراحل بعد آن مثل الکتروفورز، آشکارسازی و مستندسازی (Post PCR) از یکدیگر است. همچنین باید فضای جداگانه‌ای برای آماده‌سازی نمونه‌ها قبل از استخراج اسیدهای نوکلئیک پیش‌بینی شود. در فضای قبل از ورود به این دو اتاق یک فضای مشترک (پیش‌ورودی) باید باشد که روشویی داشته و امکان تعویض لباس و روکشی یا دمپایی در آن در نظر گرفته شود. همچنین وجود کفشوی در این اتاق برخلاف اتاق‌های Pre-PCR و Post PCR الزامی است. فضایی که در آن عملیات استخراج انجام می‌شود باید دارای فشار مثبت باشد. فضای Pre PCR و Post PCR تا حد امکان باید دور از یکدیگر بوده و کانال هواسازهای این فضاها باید کاملاً از یکدیگر مستقل باشد. همچنین توصیه می‌شود هر یک از این فضاها مجهز به سینک و فاضلاب مستقل باشد.

تعمیرات (تاریخ خروج از کار، تاریخ سرویس یا تعمیر، نحوه ضد عفونی قبل از ارسال، شرح تنظیمات و تعمیرات،...) باید موجود و پس از سرویس و تعمیر و قبل از ورود مجدد به جریان کار، باید عملکرد آن با کنترل های مناسب ارزیابی شده و مستندات آن موجود باشد. به علت حساسیت ذاتی آزمایش های مولکولی، لازم است کاربران مجاز برای هر دستگاه تعیین شده و آموزش های لازم جهت کاربری به آن ها داده شود. برای اطمینان از عملکرد تجهیزات از قبیل سانتریفیوژها، میکروسانتریفیوژ، وسایل حرارتی (حمام آب گرم، ترموسایکلر و بلوک حرارتی)، وسایل برودتی (یخچال، فریزر) و میکروپیپت ها باید برنامه نگهداری و کالیبراسیون دوره ای موجود و سوابق آن نگهداری شود. همچنین در چیدمان تجهیزات در فضاهای اختصاصی باید به جریان کار یک طرفه، فاصله مناسب برای عدم تداخل دستگاه ها در کار یکدیگر، دسترسی مناسب، ملاحظات ایمنی و شرایط عملکرد بهینه توجه کرد.

◀ **مدیریت بهداشت و ایمنی زیستی:** فضاها و امکانات اختصاص داده شده برای فرآیند تشخیص مولکولی باید با سطح ایمنی زیستی مورد نیاز برای میکروارگانیسم های مورد جستجو تناسب داشته باشد، همچنین ملاحظات ایمنی کار با معرف ها و مواد شیمیایی خطرناک (فنل، اتیدیوم بروماید) و مواد رادیواکتیو باید رعایت گردد. همچنین در دفع پسماند تا احتمال انتشار عوامل بیماریزای موجود در نمونه بیمار به حداقل برسد. برای آلودگی زدایی سطوح در فضاهای اختصاص داده شده، می توان از محلول رقیق هیپوکلریت سدیم کمک گرفت که درعین ارزان بودن در صورت استفاده بجای رعایت اصول ایمنی به اندازه کافی کارایی دارند. لامپ UV به تعداد مناسب برای از بین بردن آلودگی های احتمالی باید وجود داشته باشد، لذا ضروریست زمان لازم استفاده شده و فاصله تنظیم شده مناسب باشد و لامپ با طول موج مفید استفاده شود. لامپ UV می بایست در فواصل زمانی منظم تمیز شود تا گردوغبارهای موجود بر سطح مشکلی برای اثربخشی آن نداشته باشد. وسایل حفاظتی از قبیل عینک حفاظتی در برابر اشعه UV

فضای آزمایشگاه تشخیص مولکولی باشد. دمای فریزر باید روزانه چک و ثبت شود. برای اجتناب از نوسانات دمای ناشی از مراجعات مکرر به فریزر، فضای داخل آن برای نگهداری نمونه ها، مواد و معرف ها به طور مجزا طبقه بندی شود. فریزر ضد برفک برای نگهداری نمونه ها و معرف ها مناسب نیست. برای نگهداری RNA به مدت طولانی استفاده از فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد توصیه می شود. استفاده از قسمت یخدان یخچال به عنوان فریزر برای نگهداری غالب مواد و معرف ها به هیچ عنوان توصیه نمی شود. نگهداری نمونه تخلیص شده در کنار نمونه های بیماران ممکن است باعث آلودگی نمونه تخلیص شده شود، بنابراین توصیه می شود نمونه های بالینی از مواد تخلیص شده در طبقات جداگانه نگهداری شود. کلیه مواد مورد نیاز برای انجام آزمایش PCR و تهیه مخلوط واکنشی باید کاملاً جدا از نمونه بیماران و مواد تخلیص شده در فریزر نگهداری شود. فریزر مواد و نمونه ها، ترجیحاً باید در فضای Pre-PCR باشد. از فریزر فضا Post-PCR به هیچ عنوان نباید برای نگهداری نمونه ها و مواد مربوط به فضای Pre-PCR استفاده کرد. تأمین کنندگان معرف ها، کیت ها و تجهیزات باید مورد تأیید وزارت بهداشت باشند. مواد و کیت های آزمایشگاهی مورد استفاده باید دارای برچسب مشخصات شامل ماهیت معرف، تاریخ ساخت، انقضا، سری ساخت و شرایط نگهداری باشد. همچنین باید مستندات مربوط به فرآیند خرید و انبارش شامل: فهرست موجودی، نقطه سفارش و... موجود باشد.

◀ **مدیریت تجهیزات:** تمامی تجهیزات باید دارای شناسنامه و دستورالعمل فنی باشد. اطلاعات لازم این مستندات طبق موارد مندرج در "الزامات تجهیزات آزمایشگاهی" مشخص می شود. در مورد تجهیزاتی که بیش از یک کاربر دارند، باید برگه ثبت اطلاعات کاربری (log book) داشته باشند تا اطلاعات هر نوبت استفاده از دستگاه (نام کاربر، تاریخ و ساعت استفاده از دستگاه و وضعیت دستگاه در شروع و خاتمه کار) را نشان دهد. پس از خرید و نصب دستگاه و قبل از شروع به کار، دستگاه باید با کنترل مورد ارزیابی قرار گرفته و مستندات آن آرشیو شود. سوابق مربوط به سرویس و



FIDAR RAVIKA PHARMED

فیدار رایکا فارمد | نماینده انحصاری

تهران، بلوار میرداماد، خیابان شمس تبریزی جنوبی، خیابان رامین پلاک ۱۶ واحد ۲۰ | تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۲۷۱۴۹۵ | ۰۲۱۹۱۳۲۲۲۲۰ | ۰۲۱۲۱۰۰۰۹۳۳ | www.FRPharmed.com



molbio®
INNOVATE • IMPACT • INSPIRE





باشد. همچنین تاریخ و ساعت پذیرش، نمونه‌گیری و شرح حال بیمار و اطلاعات بالینی لازم و نام افراد مسئول آن هنگام پذیرش باید ثبت شود. معیارهای رد یا قبول نمونه‌های مختلف مکتوب شده و تمهیدات لازم برای تماس به موقع با پزشک و بیمارپیش‌بینی شود.

حداکثر فاصله زمانی قابل قبول بین جمع‌آوری نمونه تا انجام آزمایش و شرایط مناسب نگهداری نمونه‌ها قبل از انجام آزمایش، باید مکتوب و رعایت شود. کیت‌های مورد استفاده در تمام مراحل آزمایش‌های تشخیص مولکولی، باید دارای تأییدیه‌های بین‌المللی یا وزارت بهداشت بوده و برای استخراج اسید نوکلئیک، نمونه‌های مختلف باید از کیت‌های متناسب با آن استفاده شود. در صورت عدم استفاده از کیت‌های معتبر یا تغییر در روش‌های اجرایی و یا استفاده از پروتکل‌های خانگی، باید صحه‌گذاری شده و نتایج با روش معتبر و مورد تأیید مقایسه و مستندات مربوطه نگهداری شود.

به صورت منظم عملکرد و پایداری کیت‌های مورد استفاده و همچنین صحت عملکرد فرآورده‌های تشخیصی جدید، قبل از استفاده باید با نمونه‌های کنترلی بررسی شده و مستندات آن موجود باشد. در هر نوبت آزمایش، باید تاریخ، ساعت و نام فرد انجام دهنده و مشخصات معرف‌ها، کیت‌ها، استانداردها و کنترل‌های مورد استفاده ثبت شود. مطابق با اصول مستندسازی باید دستورالعمل انجام آزمایش و سیاست آزمایشگاه برای لزوم تکرار آزمایش یا تأیید نتایج (بررسی اطلاعات بالینی و سایر آزمایش‌ها، ارسال به آزمایشگاه‌های معتبر دیگر و...) سوابق رعایت این موارد مستند شود.

کیفیت سوابق انجام آزمایش مانند تصاویر، نمودارها و منحنی‌ها باید مناسب و قابل آنالیز بوده و در صورتی که از روش آماری یا فرمول محاسباتی یا نرم‌افزار خاص برای به دست آوردن نتیجه نهایی استفاده می‌شود، از درستی و اعتبار آن اطمینان حاصل شود.

❖ مدیریت کنترل کیفی: مسئول فنی باید روش‌های

در هر مکانی که از این اشعه استفاده می‌شود، خاصه هنگام مشاهده نتایج بروی UV transilluminator الزامی است. توصیه می‌شود از وسایل مجهز به فیلترهای UV-B با محدوده ۳۰۰ تا ۳۱۲ نانومتر استفاده شود.

❖ مدیریت کارکنان و مستندات: مسئول فنی باید نظارت کامل بر فرآیندهای بخش تشخیص مولکولی (شامل کنترل مدارک و سوابق، ارزیابی صلاحیت کارکنان، فرآیندهای قبل، حین و بعد از آزمایش، کنترل کیفیت، ایمنی، مدیریت تجهیزات، خرید و انبارش و مدیریت عدم انطباق) را داشته باشد. پرسنل فنی باید حداقل دارای مدرک کارشناسی علوم آزمایشگاهی یا رشته‌های مرتبط باشند. شرح وظایف، مسئولیت‌ها و اختیارات هر یک از پرسنل باید توسط مسئول فنی به صورت مکتوب مشخص شده و صلاحیت کارکنان برای انجام وظایف برای مسئول فنی محرز شده باشد. باید برنامه مشخصی برای آموزش کارکنان موجود باشد و کارکنان آموزش‌های لازم جهت انجام وظایف را دریافت کرده و سوابق ارزیابی دوره‌ای صلاحیت کارکنان موجود باشد.

مسئول فنی باید دستورالعمل پذیرش، آماده‌سازی و نمونه‌گیری را تأیید کند. در این دستورالعمل باید سیاست عدم پذیرش نمونه‌های نامناسب و نحوه مطلع کردن پزشک از نامناسب بودن نمونه به روشنی قید شود. در صورتیکه آزمایشگاه طرف قرارداد همکاری با مراکز دیگر داشته باشد، موظف است روش تهیه و ارسال نمونه و رعایت شرایط لازم چون زنجیره سرد را در دستورالعمل قید کند. همچنین باید کلیه پروتکل‌های کاری شامل فرآیندهای قبل و بعد از PCR به همراه کلیه مستندات مربوط به نتایج هر نمونه در دسترس باشد. مستندات مربوط به هر آزمایش، تا دو سال باید نگهداری شود. دستورالعمل اجرایی هر پروتکل کاری شامل فرآیندهای قبل PCR و یا بعد از آن به صورت کامل در آزمایشگاه موجود باشد و همچنین هرگونه تغییری که در نحوه استاندارد پروتکل آزمایش به منظور بهینه‌سازی یا سهولت روش اعمال می‌شود باید مستند و ثبت شود.

❖ فرآیندهای قبل از انجام و انجام آزمایش: باید روش مشخصی برای احراز هویت بیماران در هنگام پذیرش، آماده‌سازی بیمار، نمونه‌گیری، انتقال و نگهداری نمونه مستند

صحه‌گذاری برای پروتکل‌های استخراج ژنوم و انجام PCR را تهیه نماید. ویژگی‌های علمی هر روش تشخیصی مولکولی نظیر حساسیت، دقت و صحت باید به طور مستند تعیین و در دسترس باشد. جهت اطمینان از صحت نتایج در هر نوبت آزمایش، باید از کنترل‌های مناسب شامل کنترل مثبت (مخصوصاً کنترل حد حساسیت تشخیصی)، کنترل منفی و کنترل آب (no template control) استفاده شود.

با هدف اطمینان از عدم وجود مهارکننده واکنش در آزمایش‌های مولکولی، می‌بایست از کنترل داخلی یا روش‌های جایگزین آن استفاده کرد. کلیه دستگاه‌ها به صورت مرتب بررسی شده و مستندات کنترل کیفی شامل دستورالعمل و نتایج آن و گزارش‌های کنترل کالیبراسیون دوره‌ای موجود باشد. همچنین با توجه به اهمیت کنترل عملکرد ترموسایکلر و هیتینگ بلوک مخصوصاً به لحاظ حرارتی، باید امکانات کنترل و کالیبراسیون در آزمایشگاه موجود بوده و صحت و دقت تنظیم دما و یکنواختی آن در سرتاسر بلوک لحاظ شود. کنترل دمای هیتینگ بلوک حتی در صورت مجهز بودن به دماسنج به وسیله یک دماسنج خارجی مستقل و کالیبر توصیه می‌شود.

به صورت دوره‌ای می‌توان صحت نتایج نمونه‌های آزمایش شده را با پروتکل قابل جایگزین مورد آزمایش قرار داد یا برخی نمونه‌ها را جهت بررسی به آزمایشگاه همکار ارسال کرد و یا در برنامه‌های مهارت آزمایی یا ارزیابی خارجی کیفیت شرکت نمود. تکرار همزمان آزمایش یک نمونه می‌تواند مؤید صحت تکرارپذیری پروتکل اجرایی آزمایشگاه باشد.

فرآیندهای پس از انجام آزمایش و گزارش‌دهی نتایج:

مدت زمان، مکان و شرایط مناسب نگهداری نمونه‌های مختلف پس از انجام آزمایش مکتوب شده و رعایت می‌شود. نگهداری نمونه‌ها و موارد استخراج شده به گونه‌ای است که در صورت لزوم افراد مجاز، دسترسی مناسب به آن‌ها داشته باشند. همچنین باید توجه شود که از بازگرداندن آنچه از نمونه برای آزمایش برداشته شده است، به ظرف اصلی خودداری شود. نحوه دفع پسماندها شامل نمونه‌ها، کیت‌ها و ملزومات آزمایش باید مشخص و مکتوب شده باشد. مستندات هر

آزمایش به صورت کاغذی حداقل دو سال و الکترونیک به مدت نامحدود نگهداری شود و در صورت لزوم در دسترس افراد مجاز قرار گیرد. باید توجه شود که در برگه جواب‌دهی نوع روش یا فناوری به کار گرفته شده در تشخیص مولکولی، خصوصیات و محدودیت‌های مهم روش تشخیص مولکولی (مثل حساسیت تشخیصی یا محدودیت در تشخیص ژنوتیپ‌های خاص) و اطلاعات لازم برای تفسیر نتایج بالینی درج شود. همچنین در صورتی که برحسب ضرورت نمونه‌ای نامناسب برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، محدودیت‌ها و لزوم احتیاط برای تفسیر بالینی صحیح نتایج درج شود. فهرست نتایج بحرانی باید مکتوب و در دسترس همه کارکنان مرتبط باشد. گزارش نتایج بحرانی باید به سرعت انجام شده و سوابق مرتبط باید نگهداری شود. در صورت لزوم باید نتیجه آزمایش با سایر آزمایش‌های مرتبط و سوابق بالینی مقایسه شود. همچنین باید فاصله زمانی بین پذیرش و دریافت نمونه تا گزارش نتیجه معین شده و رعایت آن پایش شود.

- مدیریت ارجاع نمونه: باید توجه شود که طبق دستورالعمل ضوابط ارجاع نمونه‌ی آزمایشگاه مرجع سلامت، قرارداد مشخصی برای نوع ارتباط، مسئولیت‌ها و تعهدات طرفین مکتوب و مشخص باشد. همچنین مشخصات بیماران و نمونه‌های ارسالی و نوع آزمایش‌های درخواستی و نتایج آن‌ها باید به صورت مناسب ثبت و نگهداری شود. شرایط لازم جهت انتقال و نگهداری نمونه از نظر درجه حرارت، زمان، ظرف و ... با هدف حفظ کیفیت نمونه و رعایت اصول ایمنی زیستی باید رعایت شود. همچنین حمل و نقل مناسب طبق دستورالعمل یادشده با هدف حفاظت و ایمنی فردی صورت گیرد.

منابع:

- دستورالعمل عملکرد مطلوب آزمایشگاهی در آزمایشگاه تشخیص مولکولی (GLP) / آزمایشگاه مرجع سلامت Establishment of PCR laboratory in developing countries 2nd edition.
- Molecular Diagnosis Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline (NCCLS document MM3-A)
- Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods; J B Henry y, 20th edition .



FIDAR RAYKA PHARMED

فیدار رایکا فارمدا نماینده انحصاری

www.FRPharmed.com



molbio®

INNOVATE • IMPACT • INSPIRE



immuno concepts



FENGHUA



瀚远基因 SUPERYEARS

تهران، بلوار میرداماد، خیابان شمس تبریزی جنوبی، خیابان رامین پلاک ۱۶ واحد ۲ | تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۷۱۴۹۵ | ۰۲۱۹۱۳۲۲۲۲۰ | ۰۲۱۲۱۰۰۰۹۳۳۱