

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

ردیف	الزام	امتیاز	بله	خیر	اقدام اصلاحی	یافته ها و توضیحات
	فضا و محیط انجام آزمایش های مولکولی (۱۸ امتیاز)					
	توجه: الزامات مربوط به طراحی و جداسازی فضای آزمایشگاه مولکولی به روش مورد استفاده برای انجام آزمایش بستگی دارد. در روشهای Conventional PCR که در مرحله Post-PCR خطر آلودگی بالا است، جداسازی فضاهای فیزیکی با تاکید بیشتری باید انجام شود، در حالیکه در روش Real-Time PCR به دلیل ادغام مراحل تکثیر و آنالیز در یک سیستم کاملاً بسته، خطر آلودگی کاهش یافته و جداسازی فضاها با سخت گیری کمتری صورت می گیرد. در این موارد تاکید بر انجام کار زیر Work station های مجزا و مستقل می باشد. لازمست امتیازدهی به سوالات زیر با در نظر گرفتن این موضوع و با توجه به توضیحات ضمیمه پیوست صورت گیرد.					
۱	آیا فضای تمیز مجزا برای آماده سازی محلول ها و معرف ها (از جمله Master mix) موجود است؟	۳				
۲	آیا فضای جداگانه برای آماده سازی نمونه، استخراج اسید نوکلئیک و اضافه کردن آن به Master mix، در مرحله پیش از تکثیر، وجود دارد؟	۳				
۳	آیا فضای اختصاصی و مجزا جهت تکثیر اسید نوکلئیک و شناسایی محصول تکثیر وجود دارد؟	۳				
۴	آیا وسایل جداگانه و اختصاصی (شامل وسایل حفاظت فردی، ابزار و تجهیزات، ملزومات مصرفی، دفترچه، لوازم تحریر و ...) برای فضاهای کاری مختلف در نظر گرفته شده است؟	۳				
۵	آیا جریان کاری یک طرفه (Unidirectional workflow) بین فضاهای انجام کار رعایت میشود؟ (حرکت کارکنان و نمونه از فضای تمیز به سمت نواحی آلوده)	۳				
۶	آیا بر اساس ارزیابی ریسک (ارزیابی احتمال وقوع و عواقب ایجاد آلودگی)، سایر تمهیدات لازم جهت پیشگیری از آلودگی به اجرا درآمده؟ (مثل ایجاد فشار هوای منفی و مثبت به نحو مقتضی، وجود سیستم Air-Lock، پیش اتاق (Ante room) و غیره)	۳				
	فرآیند پیش از آزمایش (۱۳ امتیاز) جمع آوری، نگهداری و انتقال نمونه ها					
۷	آیا دستورالعمل های مرتبط با فرآیند پیش از آزمایش موجود بوده، کارکنان مرتبط از آن آگاهی داشته و رعایت می کنند؟ شامل:	۳				
	☐ دستورالعمل های جمع آوری و نگهداری نمونه ها قبل از آزمایش ☐ معیارهای رد/ پذیرش نمونه ها در آزمایشگاه ☐ نحوه بسته بندی و انتقال نمونه ها (برای نمونه های ارجاعی)					
۸	آیا نمونه هایی که بلافاصله آزمایش روی آنها انجام نمی شود، در شرایط مناسب نگهداری می شوند؟ (مشاهده محل و شرایط نگهداری نمونه ها در یخچال، فریزر ۲۰- و یا سایر شرایط توصیه شده برای نگهداری نمونه های مختلف)	۲				
۹	آیا آزمایشگاه بسته بندی مناسب (بسته بندی سه لایه و یا بسته بندی مطابق با استانداردها و ضوابط موجود) جهت ارسال نمونه ها در شرایط فیزیکی مناسب انجام می دهد؟ (مشاهده نحوه بسته بندی و رعایت شرایط فیزیکی مناسب برای انتقال نمونه ها و رعایت محدوده زمانی تعیین شده)	۳				
۱۰	آیا سیستمی برای اطلاع رسانی فوری به بیمار یا پزشک در صورت رد نمونه موجود است؟ (بررسی نحوه و افراد مسئول اطلاع رسانی در صورت رد نمونه)	۲				

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

۱۱	آیا نحوه پیگیری برطرف کردن و پیشگیری از تکرار مشکلات مرتبط با نمونه هایی که از سایر مراکز به آزمایشگاه ارجاع شده اند، مشخص بوده و انجام می شود؟ (بررسی سوابق اقدامات انجام شده در مواردی مثل اشکال در حجم یا کیفیت نمونه، اشکال در ظروف نمونه گیری، حمل و انتقال نامناسب نمونه، ناکافی بودن اطلاعات مندرج در درخواست آزمایش، مخدوش بودن مشخصات بیمار یا نمونه و ...)	۳			
	فرآیند انجام آزمایش و کنترل کیفیت نتایج (۳۲ امتیاز)				
۱۲	آیا دستورالعملهای مرتبط با فرآیند انجام آزمایش و کنترل کیفیت نتایج موجود است و کارکنان مرتبط از آن آگاهی داشته و اجرا می کنند؟ شامل: ☐ دستورالعمل صحنه گذاری/ تصدیق روش های انجام آزمایش ☐ دستورالعمل استخراج اسیدهای نوکلئیک ☐ دستورالعمل انجام آزمایش های مختلف/ بروشور کیت های مربوطه ☐ دستورالعمل کنترل کیفیت انجام آزمایش	۴			صحنه گذاری (Validation) دستورالعمل صحنه گذاری و سوابق انجام آن برای معرفهای ساخته شده و روشهای توسعه یافته در آزمایشگاه (LDT) قبل از به کار گیری آنها برای آزمایش بیمار تصدیق (Verification) دستورالعمل تصدیق و سوابق اجرای آن برای معرفها و کیت های تجاری جدید یا شماره ساخت جدید (قبل از استفاده برای آزمایش بیمار) در مقایسه با معرفها و کیت های مورد تایید یا مواد مرجع
۱۳	آیا از روشهای صحنه گذاری/ تصدیق شده برای استخراج ژنوم استفاده میشود؟ (بررس سوابق صحنه گذاری/ تصدیق روش های استخراج ژنوم)	۵			
۱۴	آیا از روشهای صحنه گذاری/ تصدیق شده برای انجام آزمایش استفاده میشود؟ (بررس سوابق صحنه گذاری/ تصدیق روش های انجام آزمایش)	۷			
۱۵	آیا مواد مصرفی، معرف ها و کیت های تجاری از تامین کنندگان مجاز خریداری می شوند؟ (بررسی ثبت مواد مصرفی، معرفها و کیت های تجاری در IMED)	۲			
۱۶	آیا از کنترل های مناسب جهت کنترل کیفیت آزمایش استفاده شده و در تفسیر نتایج ران کاری مورد استفاده قرار می گیرد؟ ☐ کنترل مثبت مرحله تکثیر یا PCR ☐ کنترل منفی مرحله تکثیر یا PCR ☐ کنترل استخراج ☐ کنترل داخلی (Internal control)	۸			
۱۷	آیا سوابق مربوط به مراحل مختلف هر سری (run) انجام آزمایش، ثبت و نگهداری می شوند؟ (بررسی سوابق ثبت اطلاعات هر ران کاری شامل تاریخ، ساعت، فرد/ افراد انجام دهنده، مشخصات کیت ها، معرف ها و کنترل های مورد استفاده)	۳			
۱۸	آیا آزمایشگاه در برنامه مهارت آزمایی یا سایر مقایسه های بین آزمایشگاهی شرکت می کند؟ (بررسی سوابق شرکت در این برنامه ها)	۳			
	تجهیزات آزمایشگاهی (۸ امتیاز)				
۱۹	آیا دستورالعملهای کنترل و نگهداری تجهیزات/ کتابچه راهنمای تجهیزات در دسترس کارکنان مرتبط قرار دارد؟	۲			
۲۰	آیا برنامه ریزی مشخصی برای کنترل و نگهداری پیشگیرانه (PM) تجهیزات موجود است و بطور دوره ای به اجرا در می آید؟ (بررسی سوابق کنترل و نگهداری ابزار پایه تا تجهیزات و سیستم های انجام آزمایش)	۶			

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

					فرآیند پس از آزمایش و گزارشدهی نتایج (۱۱ امتیاز)	
۲۱			۲		آیا زمان چرخه کاری هر آزمایش (مدت زمان بین پذیرش نمونه تا آماده شدن نتیجه آزمایش) در آزمایشگاه تعیین شده و قابل ردیابی است؟	
۲۲			۲		آیا تمام اطلاعات مورد نیاز در مورد نتایج آزمایش ها (با توجه به ضوابط و مقررات وزارت بهداشت) در برگه گزارش بیمار درج می شود؟	
۲۳			۲		آیا اطلاع رسانی فوری نتایج بحرانی به بیمار یا پزشک معالج صورت میگیرد؟ (بررسی نحوه و افراد مسئول اطلاع رسانی موارد بحرانی و سوابق انجام آن)	
۲۴			۲		چنانچه بنا به ضرورت، آزمایش روی نمونه نامناسب انجام شده باشد، آیا جهت اطلاع پزشک معالج این مطلب در برگه گزارش درج می گردد؟ (بررسی سوابق مربوطه)	
۲۵			۳		آیا نحوه و شرایط نگهداری، و مدت ذخیره سازی نمونه ها پس از انجام آزمایش مشخص است؟ (مشاهده محل و شرایط ذخیره سازی نمونه ها پس از آزمایش، مدت زمان نگهداری نمونه ها و ...)	
					الزامات ایمنی و مدیریت پسماند (۱۸ امتیاز)	
۲۶			۱		آیا دستورالعمل های مرتبط با ایمنی کارکنان در آزمایشگاه موجود است و کارکنان از آن آگاهی کامل دارند؟	
۲۷			۲		آیا کار با نمونه های بالینی که بالقوه تولید آئروسول های خطرناک می کنند، زیر کابینت های ایمنی بیولوژیک کلاس دو انجام می شود؟	
۲۸			۲		آیا ارزیابی عملکرد کابینت های ایمنی بیولوژیک، و پایش و ثبت جریان هوا در آنها به صورت دوره ای انجام می شود؟	
۲۹			۱		آیا وسایل حفاظت فردی به اندازه کافی در فضاهای کاری جداگانه بخش مولکولی (با توجه به حجم کار و تعداد کارکنان) و متناسب با مخاطرات موجود، در دسترس کارکنان هست؟	
۳۰			۲		آیا کارکنان آزمایشگاه از وسایل حفاظت فردی به درستی و متناسب با ریسک کاری که انجام میدهند (Risk-based) استفاده میکنند؟	
۳۱			۳		آیا ضدعفونی و آلودگی زدایی موارد زیر به روش مناسب اجرا میشود : ☐ بسته های حمل نمونه ، لوله ها، میکروتیوبهای PCR ☐ وسایل حفاظت فردی چند بار مصرف ☐ سکوها، سطوح کاری، تجهیزات ...	
۳۲			۱		آیا دستورالعمل نحوه دفع پسماندها و امحاء نمونه های آزمایشگاهی در آزمایشگاه موجود است؟	
۳۳			۱		آیا پسماندهای عفونی و غیر عفونی از هم تفکیک می شوند؟ (مشاهده کیسه های زباله زرد مجزا، برای تفکیک پسماند عفونی)	
۳۴			۳		آیا پسماندهای عفونی توسط اتوکلاوهای کنترل شده (با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و بیولوژیک) اتوکلاو می شوند؟	
۳۵			۲		آیا نگهداری و امحاء سایر پسماندها (مثل پسماندهای مربوط به مواد شیمیایی مصرف شده) به روش صحیح اجرا می شود؟	

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

ضمیمه: اصول طراحی و جداسازی فضای آزمایشگاه مولکولی و پیشگیری از آلودگی

الف) طرح ایده آل فضای آزمایشگاه مولکولی شامل سه ناحیه جداگانه است: ۱- فضای آماده سازی معرف ها ۲- فضای آماده سازی نمونه و استخراج اسید نوکلئیک ۳- فضای تکثیر و آنالیز محصول تکثیر

فضای آماده سازی معرف ها باید منحصراً به تهیه و نگهداری معرف ها، آماده سازی مسترمیکس، انتقال آن به تیوب های PCR، و تقسیم محلول ها و معرف ها به حجم های کوچک تر (جهت جلوگیری از فریز-ذوب مکرر و آلودگی متقاطع) اختصاص یابد. ایجاد فشار هوای مثبت در فضای آماده سازی معرف ها سبب ممانعت از ورود آئروسول ها و آلودگی های DNA یا RNA به این فضا می گردد.

فضای آماده سازی نمونه برای نگهداری، آماده سازی و پردازش نمونه، aliquot کردن نمونه، استخراج اسید نوکلئیک و تهیه کنترل های مثبت و منفی استفاده می شود. ایجاد فشار منفی در این فضا سبب می شود آئروسول های تولید شده در آن محبوس شده و آلودگی به بیرون راه پیدا نکند.

فضای تکثیر و آنالیز محصول تکثیر به عنوان ناحیه آلوده در نظر گرفته می شود. این فضا باید منحصراً به انجام واکنش های تکثیر (با استفاده از ترموسایکلر یا دستگاه های Real-time PCR) و آنالیز محصولات تکثیر (امپلیکون) اختصاص یابد. ایجاد فشار هوای منفی در این فضا (نسبت به راهرو و سایر نواحی آزمایشگاه) از انتشار آئروسول ها و آلودگی جلوگیری می کند. این فضا باید حداکثر فاصله فیزیکی ممکن را از نواحی آماده سازی معرف و نمونه داشته باشد و انجام کار زیر PCR Workstation مجزا انجام شود.

ب) طراحی و جداسازی فضای آزمایشگاه مولکولی با در نظر گرفتن روشهای انجام آزمایش و بار کاری

آزمایشگاه: در روش های Conventional PCR باز کردن لوله های حاوی امپلیکون تکثیر یافته برای انجام ژل الکتروفورز در مرحله Post-PCR، منبع مهم آلودگی است لذا جداسازی کامل فضاهای فیزیکی ضروری می باشد. در حالیکه در روش Real-Time PCR به دلیل ادغام مراحل تکثیر و آنالیز در یک سیستم بسته، خطر آلودگی کاهش یافته و ممکن است جداسازی فیزیکی فضاها با سخت گیری کمتری نسبت به روش Conventional PCR در نظر گرفته شود. در صورت استفاده از سیستم های کاملاً بسته (مانند GeneXpert) که کلیه مراحل آزمایش در یک کارتریج انجام می شود، نیاز به جداسازی فیزیکی به حداقل می رسد.

سایر تمهیدات پیشگیری از آلودگی مانند ایجاد فشار مثبت و منفی نیز به روش و سیستم آزمایش بستگی دارد. در آزمایشگاه هایی که از سیستم های کاملاً بسته و یکپارچه استفاده می کنند، با توجه به ارزیابی ریسک (ارزیابی احتمال و عواقب بروز آلودگی) ممکنست فشار در همه اتاق ها/ فضاها خنثی باشد. در حالیکه در روش های Conventional PCR که در مرحله Post-PCR لوله های حاوی امپلیکون تکثیر یافته برای انجام ژل الکتروفورز باز می شوند، علاوه بر جداسازی فضاهای فیزیکی، تاکید بر رعایت فشارهای مثبت و منفی (که در بالا اشاره شد) وجود دارد.

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

چنانچه امکان ایجاد فشار مثبت/ منفی از طریق سیستم های کنترل فشار هوا و دستگاه هواساز نباشد، آزمایشگاه می تواند به روش های مقتضی اختلاف فشار نسبی در فضاهای انجام کار ایجاد نماید. مثلاً با قرار دادن فن دمنده (Supply fan) و فن مکند (Exhaust fan) در موقعیت های مناسب در فضای کاری و تنظیم دور پره های فن ها، می توان فشار هوای مثبت یا منفی نسبی ایجاد نمود.

ج) ادغام فضاهای آماده سازی معرف و آماده سازی نمونه در یک مکان:

آزمایشگاه ممکنست با توجه به بکارگیری سیستم های بسته آزمایش و یا به دلیل محدودیت در فضای فیزیکی بخش مولکولی، فضای آماده سازی معرف و آماده سازی نمونه را ادغام نماید. در این حالت فضای کار به دو ناحیه کاملاً مجزا شامل ۱- فضای Pre-PCR: مختص آماده سازی معرف (فضای بدون DNA)، و آماده سازی نمونه و استخراج اسیدهای نوکلئیک (فضای Low DNA) و ۲- فضای PCR: به تکثیر و آنالیز محصول تکثیر اختصاص پیدا می کند. برای به حداقل رساندن احتمال آلودگی، فضاها با استفاده از کابینت ها و/یا Workstation های PCR به دو زیر بخش مجزا تفکیک می شوند. در این صورت Workstation / کابینت ها با فاصله از یکدیگر (ترجیحاً حداقل ۲ متر)، و در فضایی قرار می گیرند که رفت و آمد محدود است. کابینت های مخصوص آماده سازی معرف و مستر میکس تنها برای همان منظور باید استفاده شوند و انجام فرآیندهای مربوط به آماده سازی نمونه در آن ها مجاز نمی باشد. تحت هیچ شرایطی DNA پلاسمید، DNA ژنومی، RNA، یا نمونه بیماران نباید وارد Workstation آماده سازی معرف گردد. همچنین تا حد امکان آماده سازی معرف با استخراج اسید نوکلئیک نباید همزمان انجام شوند. فاصله گذاری زمان انجام کار به این صورت است که اول آماده سازی معرف و سپس آماده سازی نمونه و استخراج انجام می گردد.

مدیریت استقرار گردش کار یک سوبه و پیشگیری از آلودگی

در طراحی فضای کار آزمایشگاه مولکولی، رعایت گردش کار یک طرفه بسیار حائز اهمیت است تا از آلودگی متقاطع و آلودگی با محصولات تکثیر (آمپلیکون) جلوگیری شود. به این منظور جریان حرکت کارکنان، نمونه ها و لوازم باید همواره از مناطق با آلودگی بالقوه کمتر (Pre-amplification) به سمت مناطق با آلودگی بیشتر (Post-amplification) باشد و از هرگونه بازگشت جلوگیری شود.

در حالت ایده آل، فعالیت هر یک از کارکنان در هر روز کاری یا هر شیفت کاری فقط باید به یک فضا (pre amplification یا post amplification) اختصاص داده شود. در صورتی که این کار امکانپذیر نباشد، کارکنان می توانند ابتدا کار را در فضای تمیز pre amplification انجام داده و سپس برای ادامه مراحل تکثیر و آنالیز محصول، به فضای post amplification بروند. رفت و برگشت کارکنان بین این دو فضا نباید صورت گیرد. این محدودیت ها باید برای کارکنان مسئول نظافت نیز اعمال شود.

انواع لوازم، وسایل و تجهیزات اعم از سمپلر، سرسمپلر، رک، جعبه میکروتیوب، خودکار، ماژیک، دستکش، روپوش، صندلی و غیره باید بصورت جداگانه به هر فضای کاری اختصاص داده شود و نباید بین فضاهای کاری جابجا و رد و بدل گردند. این وسایل به هیچوجه نباید از اتاق آماده سازی نمونه به اتاق آماده سازی معرف برده شوند و به طور مشابه، نباید از اتاق تکثیر و شناسایی محصول، به اتاق آماده سازی نمونه یا اتاق آماده سازی معرف انتقال پیدا کنند.

چک لیست ارزیابی آزمایشگاههای تشخیص مولکولی – برنامه عملیاتی ۱۴۰۵

لوازم حفاظت فردی ترجیحا از نوع یکبار مصرف باشند، از همدیگر تفکیک شده و بطور مجزا به هر فضا اختصاص داده شوند. یخچال‌ها و فریزرها نباید بین فضاهای آماده‌سازی معرف و آماده‌سازی نمونه مشترک باشند تا از آلوده شدن معرف ها با نمونه‌ها و اسیدهای نوکلئیک استخراج شده جلوگیری شود. اگر این کار امکان پذیر نیست، باید جداسازی کامل با استفاده از قفسه بندی مجزا و ظروف بیرونی ثانویه (secondary exterior containers) انجام شود. محصول تکثیر هرگز نباید در یک مکان و فضای مشترک با معرف ها، نمونه ها یا اسید نوکلئیک استخراج شده، نگهداری شوند. سطوح کاری، به ویژه فضای داخل Workstations باید قبل و پس از انجام کار، توسط اشعه UV آلودگی زدایی شوند. فضای کاری همیشه باید قبل و بعد از آماده‌سازی معرف ها با استفاده از محلول رقیق شده ۱ به ۱۰ سفید کننده خانگی (با کلر فعال ۵٪) و سپس با اتانول ۷۰٪ (برای پاک کردن بقایای محلول هیپوکلریت سدیم و پیشگیری از خوردگی)، و یا هر نوع محلول تمیزکننده مناسب تجاری دیگر که مخصوص سطوح باشد، تمیز گردد.