Downloaded from labdiagnosis.ir at 9:38 +0330 on Monday December 17th 2018

چرا ضروریست در انجام و طراحی آزمایش‌های مولکولی کنترل داخلی در نظر گرفته شود

• دکتر مسعود حاجیا
استاد میکروب شناسی پزشکی
آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
massoudhajia@yahoo.com

خلاصه

آزمایشات مولکولی بیش از دو دهه می‌باشد که وارد آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شده است و توانسته‌اند پاسخگوی بسیاری از معضلات تشخیصی بیماری‌های انسانی باشند. به همین لحاظ شاهد بوده‌ایم که حجم گسترده‌ای از تحقیقات در این حیطه صورت گرفته و شرکت‌های تجاری سرمایه گذاری عظیمی را به واسطه درخواست‌ها در این حوزه انجام داده‌اند. همچنان که حساسیت و ویژگی تست از اهمیت به سزایی برخوردار است، استاندار سازی و تکرارپذیر نمودن نتایج هر یک از تست‌های مولکولی نیز هیچگاه تا به این اندازه مکتوب نشده بود. معهذا مشاهده می‌شود که تعداد قابل توجهی از نتایج منفی گزارش شده مورد رضایت پزشکان نمی‌باشد. در این مقاله سعی شده علل این مهم و نقش کنترل‌ها به ویژه کنترل داخلی بررسی شود.

کلید واژه: تشخیص آزمایشگاهی، آزمایشات ملکولی، کنترل داخلی

مقدمه

با رجوع به منابع و گزارش‌های آزمایش‌های مولکولی در آزمایشگاه‌های معتبر مشاهده می‌شود که ۷۵ الی ۸۵ درصد از آزمایش‌های مولکولی در آزمایش اول قابل اعتماد نیست و امکان اعلام نتیجه میسر نمی‌باشد به عبارتی باید آزمایش مجدداً از ابتدا تکرار گردد. البته این میزان متناسب با کمیت و تنوع تست‌های بکار گرفته شده در آزمایشگاه‌ها و همچنین تنوع نمونه‌های دریافتی می‌تواند کمتر و یا بالاتر از آن باشد. در واقع این مهم بستگی به این دارد که آزمایشگاه استانداردهای مرتبط با نمونه از بدو تهیه تا خاتمه آزمایش را چگونه رعایت نموده باشد. در مواردی مثل نمونه‌های مشکوک به HPV و یا HBV میزان تکرارها می‌تواند بالاتر باشد گر چه علل آن هم اساساً ممکن است یکی نباشد.

حال با تصور اینکه آزمایش در شرایط مناسب انجام شده و تمامی استانداردهای لازمه در نظر گرفته شده باشد باید توجه داشت که نتیجه منفی درصد قابل توجهی از نمونه‌ها در آزمایش اول می‌تواند به واسط وجود مهار کننده‌هایی باشد که سبب بلوکه شدن آزمایش و وقوع منفی نتیجه کاذب باشد. متاسفانه هنوز مشاهده می‌شود که تعداد قابل توجهی از آزمایشگاه‌ها در آزمایش‌های روزانه خود تنها به استفاده ید و لوله آزمایش به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی برای هر نوبت کاری اکتفا می‌نمایند که این خود نیز می‌تواند ناکافی و حتی گمراه کننده باشد (رفرانس). حال در

صورت مناسب بودن و رعایت شرایط صحیح بکار گیری کنترل منفی و مثبت سؤال این است اگر در نمونه آزمایش ما با نتیجه منفی مواجه باشیم آیا در صورت مثبت شدن کنترل می‌توان به نتیجه منفی آزمایش اطمینان نمود؟ واضح است که هر نمونه مورد آزمایش و هر لوله آزمایش مرتبط با نمونه خاص دارای شرایط خاص آن نمونه می‌باشد که ممکن است سبب مهار انجام واکنش در آن لوله شده باشد خواه کنترل مثبت کار کرده باشد یا کار نکرده باشد.

ممانعت کننده‌ها

نمونه‌های کلینیکی معمولاً حاوی موادی هستند که در صورت عدم حذف کامل می‌توانند در انجام مؤثر واکنش PCR خلل وارد نماید. این مهار کننده‌های واکنش ممکن است ناشی از خود نمونه بالینی باشد که بسته به منشاء اولیه متفاوت خواهد بود و یا مرتبط با ویژگی معرف‌های استفاده شده در مراحل تخلیص مانند دترجنت ها، فنل، پروتئیناز K و نمک‌ها و سیستم‌های بافری باشد. برخی از ممانعت کننده‌ها ممکن است تحت شرایط دیگری، همانند آلودگی‌های ظرف نمونه به مواد شیمیایی متفاوت به نمونه، راه پیدا نموده باشند. در بسیاری اوقات دیده شده که نمونه‌های سرم و خون تهیه شده به لوله‌های آزمایش به ظرف‌هایی انتقال داده می‌شوند که دارای مواد ضد انعقاد مانند هپارین هستند و یا این که این ظرف‌ها توسط محلول‌های اسیدی رقیق و غیره شست‌وشو داده شده است، که این می‌تواند در میزان موفقیت روش تخلیص تأثیر گذار باشد. همچنین در برخی موارد دیده شده است که نمونه خون به محیط‌های کشت خون انتقال داده شده است. در این حالت با رقیق شدن میزان نمونه از شانس جداسازی اسید نوکلئیک نیز کاسته می‌شود و شاید به نتیجه منفی کاذب بیانجامد. یکی از نکات دیگری که باید بدان توجه داشت، تحت درمان بودن بیمار است. وجود داروهای گوناگون در نمونه‌های خون و سرم در میزان تکثیر ارگانیسم مربوطه تأثیر داشته و می‌تواند سبب کاهش بازیافت اسید نوکلئیک شود. گرچه ممکن است به واسطه اثرات ممانعت کنندگی احتمالی در فرآیند آزمایش PCR نیز تأثیر گذار باشد.

چرا کنترل داخلی ضروری است

یک علت ابتدایی می‌تواند خود آن کنترل مثبت باشد. در موارد متعدد گزارش می‌شود که نتیجه کنترل مثبت بسیار قوی بوده که به واسطه غلظت بالای در نظر گرفته شده می‌باشد. استفاده از این نوع کنترل مثبت بدیهی است که نتواند کاهش کیفیت مواد و آنزیم به کار گرفته شده را نشان دهد. اما مهم تر آن که ممکن است به واسطه مهارکننده‌هایی که معمولاً در نمونه تهیه شده وجود داشته باشد و در فرآیند استخراج حذف نشده سبب وقوع نتیجه منفی شده باشد که منفی کاذب خواهد بود و برای آن باید چاره ای اندیشیده شود. راهکار مناسب استفاده از کنترل داخلی برای هر یک از نمونه‌هایی می‌باشد که در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی هر نوبت آزمایش می‌توان از آن استفاده نمود. بر این اساس با توجه به اهمیت تمایز موارد منفی کاذب از موارد منفی حقیقی، استفاده از کنترل‌های داخلی از اهمیت بالایی برخوردار است.

انواع شیوه‌های بکار گیری کنترل داخلی

از آنجا که در آزمایشگاه تشخیص طبی که با تعداد بیشماری نمونه مواجه می‌باشیم ممکن است تعیین میزان موفقیت روش استخراج و همچنین میزان خلوص با استفاده از روش جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر عملی نباشد. لذا محققین سعی نموده‌اند روش‌های عملی برای این منظور معرفی نمایند. استفاده از کنترل داخلی در آزمایش PCR به صورت‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته است که می‌توان آن‌ها را به دو دسته کلی رقابتی و غیر رقابتی تقسیم نمود.

کنترل داخلی غیر رقابتی

در این شیوه علاوه برای پرایمر های اختصاصی ژنوم هدف، از یک جفت پرایمر دیگر نیز استفاده می‌گردد. این جفت پرایمر معمولاً برای ژن‌هایی طراحی شده که اطمینان نسبت به حضور آن‌ها در انواع نمونه صرف نظر از مثبت بودن یا نبودن آزمایش PCR وجود داشته باشد. از مزیت‌های این روش آن است که آن را می‌توان برای انواع

Downloaded from labdiagnosis.ir at 9:38 +0330 on Monday December 17th 2018

متفاوت آزمایش مورد استفاده قرار داد. از محدودیت‌های این شیوه متفاوت بودن شرایط آزمایش آن با شرایط لازم برای ژنوم هدف می‌باشد. نتیجه منفی حاصل از ست اختصاصی و ست کنترل داخلی نتیجه منفی کاذب تلقی شده و به معنی موفق نبودن روش خالص سازی است که باید مجدد نمونه کلینیکی مورد تخلیص قرار گیرد. در صورتی که هر دو ست پرایمر در یک لوله و از آنجا که مواد و آنزیم پلی مراز توسط ست کنترل داخل مورد استفاده قرار می‌گیرد ضروری است غلظت پرایمر های کنترل داخل در حداقل لازم مورد استفاده قرار گیرد و همچنین در طراحی اولیه برای اندازه محصول، مورد بررسی دقیق قرار گرفته باشد. یکی از اولین روش‌هایی که برای این منظور در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت انجام یک PCR ابتدایی با پرایمرهای اختصاصی برای ژنوم انسانی بود. از آنجا که در یک نمونه بالینی همواره سلول‌های انسانی وجود دارند انجام موفقیت آمیز PCR با پرایمر های مذکور نشان دهنده آن می‌باشد که مواد ژنومیک حاصل از پروسه تخلیص عاری از ممانعت کننده بوده و عمل خالص سازی به درستی صورت گرفته است.

کنترل داخلی رقابتی

پرایمر موجود علاوه بر اتصال به الگوی اختصاصی قادر به اتصال به یک قطعه دیگر می‌باشد که در داخل کیت افزوده گردیده است. این قطعه معمولاً از پلاسمیدی تشکیل شده است که نواحی مکمل پرایمر در داخل آن ایجاد گردیده و قادر به تولید محصولی با استفاده از همان پرایمر با طول بیشتری خواهد بود. در صورت عدم حضور DNA اختصاصی در نمونه خالص شده بیمار، این ناحیه تکثیر یافته و محصولی متفاوت از محصول اصلی با اندازه‌ای به مراتب بزرگ‌تر را تولید می‌نماید که قابل تشخیص و تفکیک از طول محصول اختصاصی خواهد بود. در صورت وجود DNA اختصاصی پرایمر در رقابت با قطعه کنترل داخلی به واسطه اندازه کوچک‌تر بیشتر تکثیر خواهد یافت و فرصت چندانی برای تکثیر کنترل داخلی باقی نخواهد ماند و نهایتاً در صورت عدم وجود محصول اختصاصی و محصول کنترل داخلی به معنی نتیجه منفی کاذب بوده که ناشی از عدم موفقیت روش خالص سازی می‌باشد.

در این روش باید توجه داشت که پایین‌ترین غلظت از قطعه کنترل داخلی در مخلوط واکنشی استفاده گردد. چرا که در غیراین‌صورت بواسطه مقادیر بالای آن تکثیر ژنوم هدف تحت تأثیر قرار خواهد گرفت و سبب کاهش سطح تشخیصی تست و بالطبع کسب نتیجه منفی کاذب می‌گردد.

البته باید توجه داشت که حساسیت تست کاملاً با سطح تشخیص متفاوت می‌باشد. میزان حساسیت تست اصولاً به میزان توانایی تست در شناسایی انواع تایپ‌های شناخته شده از یک ارگانیسم تعریف می‌شود. در صورتی که یک پروتکل اصولاً قادر به شناسایی برخی از تایپ نباشد آن آزمایش از حساسیت کامل برای تشخیص ارگانیسم مربوطه برخوردار نخواهد بود. بر اساس این تعریف سطح تشخیصی تست برای آن تایپ‌هایی که قابل شناسایی هستند کاربرد خواهد داشت.

در صورت عدم بهینه سازی لازم بدیهی است که پروتکل مورد استفاده حتی قادر به شناسایی آن تعداد از تایپ‌ها نیز نباشد. وجود حساسیت مناسب بستگی به طراحی اولیه پروتکل و انتخاب سکانس مناسب برای پرایمر دارد اما سطح تشخیصی بستگی به بهینه‌سازی مناسب شرایط تکثیر خواهد داشت. علاوه بر تأثیر بهینه‌سازی صحیح در سطح تشخیصی، ارتقاء روش‌های ردیابی محصول نیز واجد تأثیر تعیین کننده در سطح تشخیصی می‌باشند.

یکی از اهدافی که محقیقین در طراحی انواع پروتکل‌ها مد نظر داشته‌اند همانا این مهم بوده که بتواند دامنه سطح تشخیصی را افزایش داده و توانایی تست را جهت پایین‌ترین میزان شناسایی ژنوم موجود در نمونه بهبود بخشند. لذا نوع کنترل داخلی در نظر گرفته شده در طراحی هر تست باید به گونه ای باشد که سبب کاهش سطح تشخیصی تست نگردد.

نتیجه گیری

بکار گیری کنترل داخلی در انجام آزمایش بر روی نمونه بالینی در صورت تأیید کیفیت مناسب پروتکل اجرایی و نحوه صحیح انجام آزمایش می‌تواند ما را در اعتماد لازم نسبت به انجام صحیح پروسه استخراج نمونه‌های بالینی و کسب نتایج منفی یاری نماید.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 9:38 +0330 on Monday December 17th 2018

Downloaded from labdiagnosis.ir at 9:38 +0330 on Monday December 17th 2018

References

1- Chen B, Richards CS, Wilson JA, Lyon E (2011). Quality assurance and quality improvement in U.S. clinical molecular genetic laboratories. Curr Protoc Hum Genet, Chapter 9.

2- Dar-Afarin H (2012). Principle of documentation in Medical Laboratories, Iranian Society of Pathology, Tehran, Chapter 7.

3- Hajia M, Safadel N, Samiee SM, Dahim P, Anjarani S, Nafisi N, et al. Quality Assurance Program for Molecular Medicine Laboratories. Iran J Pub Health 2013;42 Supple1:119-124.

4- Hajia M. Limitations of current PCR protocols in clinical laboratories: A short review. Modern Medical Laboratory Journal, 2016;1(1);1-6.

5- Panteghini M, Forest JC (2005). Standardization in laboratory medicine: New challenges. Clinica Chimica Acta, 355 (1-2):1-12.

٦- حاجیا مسعود. بررسی منابع خطا در تخلیص ژنوم برای آزمایش‌های مولکولی و کنترل کیفی آن. تشخیص آزمایشگاهی. سال ۱۳۹۰، شماره ۷٤، صفحه ۸ الی ١٤.