

# **MOLEKÜLER TANIDA KALİTE YÖNETİMİ**

İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı

Dr. Cihan Coşkun

# Canadian Children's Rights Council

## WHO'S YOUR DADDY?

**Don't count on DNA testing to tell you**

From the science magazine Discover, Vol. 27 No.04, April 2006, p. 68: By Susan Kruglinski



When celebrity hairstylist Andre Chreky was hit with a paternity suit by a woman he had not been involved with for years, he was certain he couldn't lose. **Paternity tests are DNA tests, he thought, and DNA tests never lie.** So he unhesitatingly submitted a swab of cells. To his shock, he was positively identified as the father, with a 99.99 percent certainty.

But last April, after a two-year legal battle that cost Chreky \$800,000, the Fairfax, Virginia, **circuit court found that human error in the testing was probable and that the DNA results were incorrect.**

"It hurt my family; my business," Chreky says. "My life will never be the same."

DNA testing is thought of as definitive. If there is a match between two samples, then identification is certain. **Some DNA experts place the probability of an error at one in a billion. But recent cases in which paternity tests were proven to be inaccurate suggest the odds may be much less certain.**

**CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**  
**"Quality Management for Molecular Genetic Testing MM-20A"**

- There is understandable assumption from users that the results of genetic tests are reliable, whereas studies of performance in external quality assessment (EQA) schemes repeatedly show that errors occur at a measurable rate, at all stages of the testing process.
- To respond to the need for improvement in the quality of clinical genetic testing, providers are encouraged to implement a comprehensive Quality Measurement System (QMS) and to fulfill the requirements for internationally recognized standards for laboratory accreditation.

# Moleküler Tanı?

- Moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak genomun (genomik/transkriptomik), proteinlerin (proteomik) veya metabolitlerin (metabolomik) tıbbi amaçlı analiz edilmesidir.
- Nükleik asit ekstrasyonuna dayalı yöntemler.
- Nükleik asitlerin, proteinlerin ve metabolitlerin tıbbi tanıya yönelik yüksek teknolojik yöntemler kullanılarak analiz edilmesidir.

# **Analitik Yöntemler “CLSI-MM01-A3”**

- Jel Elektroforez
- Kapiller Elektroforez
- Southern/Northern Blot Analizleri
- **Polimeraz Zincir Reaksiyonu “PCR”**
  - \*PCR (Nested PCR, Asimetrik PCR, In situ PCR, \*Metilasyon PCR)
  - \*Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR)
  - \*Real-Time PCR
    - Hidroliz propları
    - Çift zincirli DNA bağlanma boylarıyla sürekli monitörizasyon
    - Floresans Rezonans Enerji Transfer Propları “FRET”
    - Moleküler Beacon Propları
    - İşaretlenmiş amplifikasyon, PCR primer ile

- DNA Dizileme
  - \*Zincir sonlandırma yöntemi  
(chain termination sequencing=**Sanger sequencing**)
  - \*Pyrosequencing
  - \*Metilasyon dizileme
  - \*Yeni kuşak dizileme yöntemi
- High Resolution Melting “HRM” analizleri
- Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)
- Mikroarray Yöntemler
  - \*Mikroarray temelli ekspresyon analizleri
  - \*Mikroarray temelli Comparative Genomic Hybridization Analizleri “CGHa”
  - \*Tek nükleotit polimorfizm “SNP” analizleri

- Direkt Mutasyon Tespit Yöntemleri (Direkt Genotipleme)
  - \*Oligonükleotit Hibridizasyon Analizleri/Allel Spesifik Oligonükleotitler "ASOs"/ dot blots
  - \*Restriction Fragment Length Polymorphism "RFLP"
- Liquid Bead Arrays
- Flap Endonükleaz-1 (FEN-1) DNA-temelli Polimeraz Amplifikasyonu
- In Situ Hibridizasyon (Fluorescence In Situ Hybridization "FISH" vb.)
- Moleküler Klonlama

# Moleküler Tanı-Tıpta Kullanım Alanları

- Moleküler Genetik-Moleküler Sitogenetik-Moleküler Onkoloji-Moleküler İmmünoloji/Mikrobiyoloji-Moleküler Patoloji

- Preimplantasyon
- Fetal/prenatal testler
- Yenidoğan taraması
- Tanısal amaçlı
- Taşıyıcılık
- Kanser tanısı ve tedavinin izlenmesi
- Patojenlerin tespiti ve tiplendirilmesi
- Parmak izi, babalık tayini (adli tıp- kriminoloji)
- Predispozisyon
- Preemptomatik
- Prognostik testler
- Farmakogenetik

**\*Bireysel Tıp-Bireysel Terapi çalışmaları**



# Toplam Kalite Yönetimi Kavramının Öncüleri

## W. Edwards Deming (1900-1993)

\*İstatistikî süreç kontrol çizelgeleri, planla-yap-denetle-uygula basamaklarına dayalı kalite planlama modeli ve toplam kalitenin 14 ilkesi.

## Walter A. Shewhart (1891-1967)

\*İstatistikî ölçme yöntemlerini üretim süreçlerine uyarlamıştır.

## Joseph M. Juran (1904-2008)

\*Juran üçlüsü-kalite planlaması, kalite kontrol ve kalite iyileştirme

**Kaoru İshikawa (1915-1989), Philip B. Crosby (1926-2001), Arman V. Feigenbaum (1922-?), Shigeo Shingo (1909-1990)**



# Tıbbi Laboratuvarlarda Toplam Kalite Yönetimi Nedir?

## Toplam:

- Test isteminden başlayıp, sonucun kullanıcılara ulaştırılmasına kadar olan tüm süreçler ve,
- Laboratuvarın her çalışanın (en üst düzey yöneticiler de dahil olmak üzere) ve laboratuvar haricindeki hizmet sürecinde görev alan dış laboratuvar(lar), tedarikçiler, numune taşıyıcı/kurye elemanları ve laboratuvarın müşterilerinin (hekimler, diğer ilgili sağlık hizmeti personeli, hastalar) belirli derecelerde sürece dahil edilmesidir.

## Kalite:

- Belirli standartlar doğrultusunda hizmet alanların beklentilerine tam ve eksiksiz yanıt verecek şekilde doğru, güvenilir ve zamanında sonuç üretilmesidir.

## Yönetimi:

- Hedeflenen kalitenin elde edilebilmesi ve sürdürülebilir olması için belirli kural, ilke, plan ve programlar doğrultusunda sistematik olarak yürütülen süreçler bütünüdür.

# Moleküler Tanı Laboratuvarlarında Kalite Yönetim Sistemi Yaklaşımı

- The European Molecular Genetics Quality Network
- EuroGentest Network of Excellence (EUGT NoE, FP6-512148, <http://www.eurogentest.org>).
- Cystic Fibrosis European Network
- European Society of Human Genetics
- The American Society of Human Genetics



# Moleküler Testlerde Kalite Yönetim Sistemi ile İlişkili Standart ve Kılavuzlar

- Moleküler genetik testlerde kalite güvencesi kılavuzu



- Moleküler Genetik Testler İçin Kalite Yönetimi Kılavuzu-MM20A



# Uluslararası Alanda Moleküler Testler ile İlgili Kalite Yönetim Sistemi Yaklaşımı-I

- **Avrupa ülkelerinde:**
  - Birçok ülkenin yasal kuralları kalite yönetiminde ISO 15189'u referans alır ve çoğu ülkede akreditasyon ve dış kalite değerlendirme programına katılma zorunluluğu vardır.
- **Avustralya ve Yeni Zelanda:**
  - **Moleküler genetik testler** dahil olmak üzere, tıbbi laboratuvarların, sağlık hizmeti ödemelerinden faydalanabilmesi için akredite olması şartı aranmaktadır.
  - "**Laboratory Accreditation Standards and Guidelines for Nucleic Acid Detection Techniques**"

# Uluslararası Alanda Moleküler Testler ile İlgili Kalite Yönetim Sistemi Yaklaşımı-II

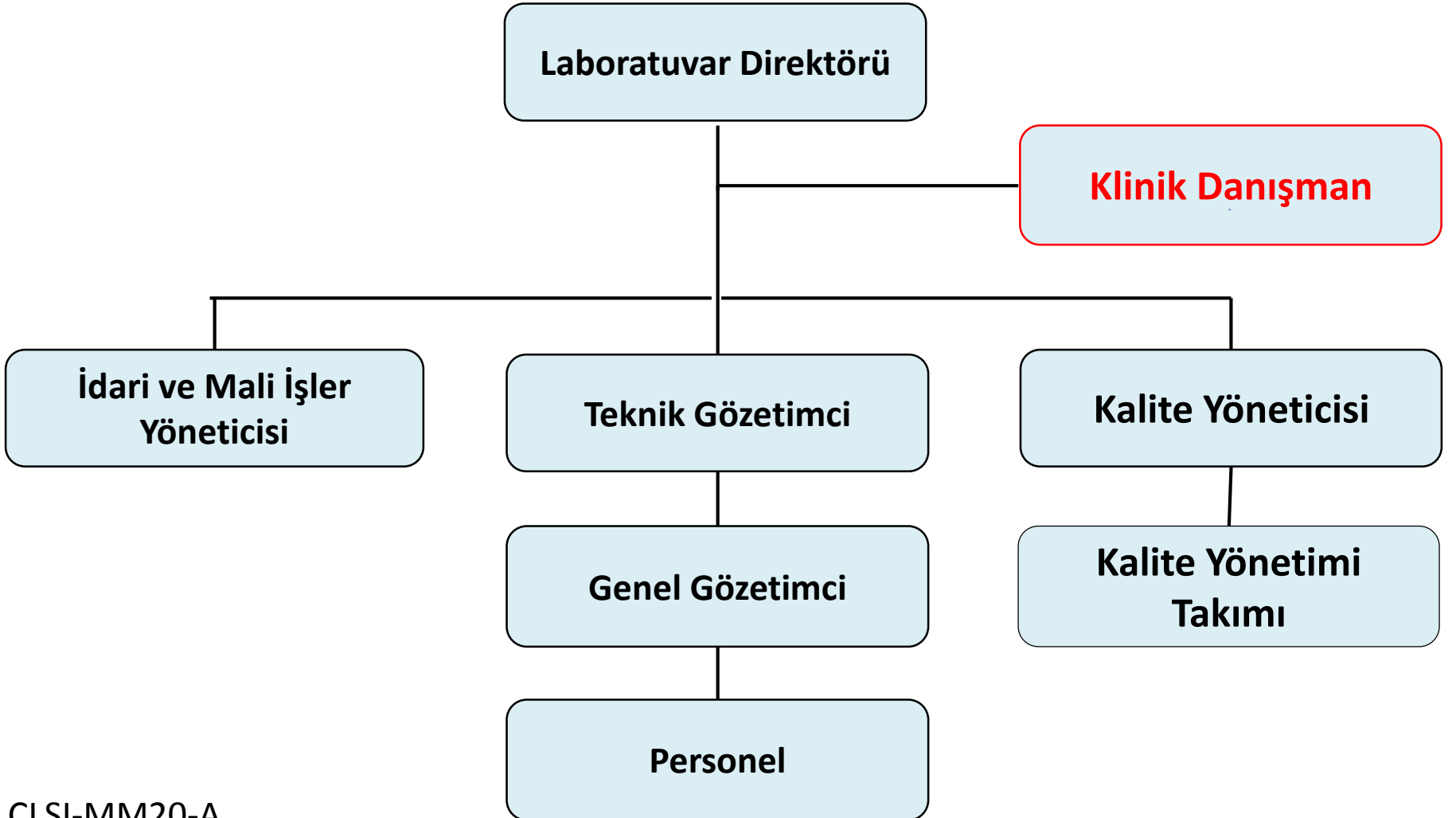
- **Kanada:**
  - **Moleküler genetik testler için**, yerel akreditasyon kuruluşları ya da ulusal akreditasyon kuruluşu tarafından akredite olmalıdır (ISO 15189 ya da Kanada versiyonuna göre).
- **Amerika:**
  - Clinical Laboratory Improvement Amendments “CLIA-88” düzenlemelerine uyum zorunluluğu bulunmaktadır.
- **Asya ve diğer ülkelerde:**
  - “The Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards” ve “The Hong Kong Accreditation Service”  
**“Moleküler genetik test laboratuvarlarında kalite güvencesi ve kalite yönetiminin iyileştirilmesi kılavuzu ”**

# Kalite Yönetim Sistemi Uygulaması (CLSI MM20-A)

Kalite Sistem İlkelerinin Uygulanması	Teknik Süreç
6.1. Organizasyon	7.1. Test Performansının Validasyon/Verifikasyonu
6.2. Personel	7.2. Analiz Öncesi
6.3. Doküman ve Kayıtlar	7.3. Analiz
6.4. Danışma Hizmetleri	7.4. Analiz Sonrası
6.5. Değerlendirme	7.5. Testlerin Kalitesinin Sağlanması
6.6. Uygunsuzluk Yönetimi	
6.7. Bilgi Yönetimi	
6.8. Sürekli İyileştirme	
6.9. Dış Laboratuvar	
6.10. Tedarikçiler	
6.11. Ekipman	
6.12. Tesis, Çevre ve Güvenlik	

# Personel Planı ve Görev Tanımları

## Tıbbi Laboratuvar Organizasyon Şeması Örneği





# Moleküler Genetik Test Kayıt Saklama Süreleri-Tavsiye/Zorunluluklar

## Kaynaklar

## Kayıt Saklama Süresi

International Organization for Standardization “**ISO 15189:2013**”

•Saklama süreleri analizin doğasına ve her bir kayda spesifik olarak düzenlenmelidir.

Clinical Laboratory Improvement Amendments “**CLIA**”

•Test istekleri, test prosedürü, analitik sistem kayıtları, dış kalite değerlendirme sonuçları ve test raporları **en az 2 yıl** kayıt altında olmalıdır.

Clinical and Laboratory Standards Institute “**CLSI MM01-A3-Molecular Methods for Clinical Genetics and Oncology Testing**”

•Kayıtlar yürürlükteki mevzuatlara uygun olarak belirlenmiş bir zaman periyodunda saklanmalıdır. **Kritik test sonuçları bir kuşak süresince (yaklaşık 25 yıl) saklanmalıdır.**

American College of Medical Genetics and Genomics: “**ACMG Standarts and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories**”

•Yasalara uygunluk dikkate alınarak, **genetik testler ile ilgili kritik kayıtlar bir kuşak (20 yıl) saklanmalıdır.**

## Danışma Hizmeti

**Kullanıcılar (Klinisyen-Hasta) ile Laboratuvar arasında etkili iletişim sağlanmalıdır:**

- Direkt görüşmeler
- Laboratuvar kitapçığı-Test rehberi
- İnternet
- Broşürler
- Eğitim ve bilgilendirme toplantıları
- Test raporları



# Bilgi Yönetimi

## Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi (LBYS):

- **Kullanıcı tarafından tanımlanabilen rapor formatı**
  - \*Otomatik yorum oluşturabilme ve manuel yorum yazabilme,
  - \*Rapor sınıflandırma; ön bilgi, sonuç, öneri vb.
- **Etnik köken, soyağacı ve hasta-aile anamnezi** gibi, sonuçların yorumlanmasında gerekli veriler sisteme girilebilmelidir.
- **Matematik işaretleri ve sembollerinin (örn: +/-, \_, [ ], \*)** yazılmasına uygun olmalıdır.

## **Bilgilerin Gizliliđi ve Güvenliği:**

- Laboratuvar, kontrolü altında olan hasta bilgilerinin gizliliğini sağlamalıdır.
- Gereklilikler yerine getirilmelidir.
- Yetkili olmayan kiřilerin tarafından eriřilebilirlik engellenmelidir.

## Veri Yönetimi-Veri Tabanları:

- Varyant diziler ve referans diziler çeşitli biyolojik veri bankalarında kayıt altına alınmakta ve sürekli güncellenmektedir.
- The Human Genome Variation Society:  
["http://www.hgvs.org"](http://www.hgvs.org)
- National Center for Biotechnology Information:  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

\*Bu bilgiler araştırmalar için referans olabilir ya da test sonuçlarının yorumlanmasında kullanılabilir.

## Dış Hizmet Laboratuvarları (Referral Laboratory)

### **Dış hizmet laboratuvar seçim prosedürü oluştururken dikkat edilecek hususlar:**

- Tıbbi, operasyonel, kalite yönetimi ve finansal açıdan değerlendirme,
- Resmi ve kurumsal gereklilikleri karşılama,
- Test ücretleri,
- Lojistik hizmetler,
- Sözleşme ya da protokol yapılması ve kapsamı.

## **Laboratuvarlar hakkında çeşitli uluslararası internet portallarından bilgi edinilebilir:**

- <http://www.eurogentest.org/laboratories/databases>
- <http://www.orpha.net>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests>

## Tedarikçilerin Değerlendirilmesi

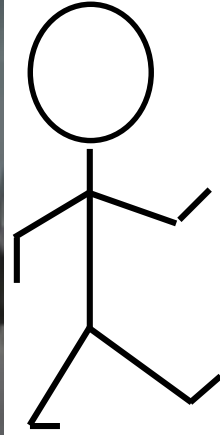
- Tedarikçi, istenilen standartlara uygun reaktif ve materyal temin edebilir mi?
- Satın alınmadan önce kritik materyallerin spesifikasyonları belirlenmeli ve açıkça yazılmalıdır. (Nükleik asit saflaştırılmasında kullanılan materyaller, floresan, kemilüminesan ve kolorimetrik boyalar, polimerazlar, deoksiribonükleotit trifosfatlar,  $MgCl_2$ ).
- Sipariş verilmeden önce primerlerin dizisi, saflığı.



## Tesis, Çevre ve Güvenlik

- Laboratuvar dizaynı, laboratuvar alanının paylaşımı-**Tek yönlü iş akışı**
- Personel ve hasta güvenliği

PCR izolasyonu  
Oda 1



Reaksiyon karışımı  
Oda 2



Amplifikasyon  
Oda 3



**Tek yönlü iş akışı**

# Güvenlik:

- Güvenlik ile ilgili eğitimler
  - \*Zararlı ve mutajenik kimyasal maddeler
  - \*Radyoaktif materyal, ultraviyole ışınlar, elektrik çarpmaları
  - \*Biyolojik ve kimyasal atıkların uygun şekilde atılması
  - \*Personel koruyucu ekipmanlarının uygun kullanımı

# TEKNİK SÜREÇ

- 7.1. Test performansının validasyon/verifikasyonu
- 7.2. Analiz öncesi
- 7.3. Analiz
- 7.4. Analiz sonrası
- 7.5. Testlerin Kalitesinin Sağlanması

# Test Performansının Validasyon/Verifikasyonu

## Klinik kullanıcılar

Klinik Karar  
Karar Verme, Hasta  
Hazırlanması, Numune  
Toplanması ve Test  
İstemi

Hasta  
Bakımı,  
Tedavisi ve  
Klinik  
Yönetimi

Test Bilgisi  
ve Danışma  
Hizmeti

Numune  
ve Test  
İstemi

Test  
Raporu ve  
Danışma  
Hizmeti

- Kullanıcı talep ve ihtiyaçları
- Klinik yeterlilik ve yarar
- Testin tipi, maliyet ve ödeme
- Mevcut metot/teknolojiler
- Gerekli numune ve materyal
- Performans karakteristikleri

**Test Performansının  
Validasyon/Verifikasyonu**

ANALİZ ÖNCESİ

ANALİZ

ANALİZ  
SONRASI

Dış Hizmet  
Laboratuvarı

**Laboratuvar**

# Analiz Öncesi

## Klinik kullanıcılar

Test seçiminde yardımcı olacak bilgiler

Klinik Karar  
Hasta ile birlikte karar verme

Hasta hazırlığı  
Hasta tanımlanması

Danışmanlık

Numune gereklilikleri ve barkotlama

Test istemi

Kitapçık,  
websitesi vb.  
Test bilgisi

Numune Transportu

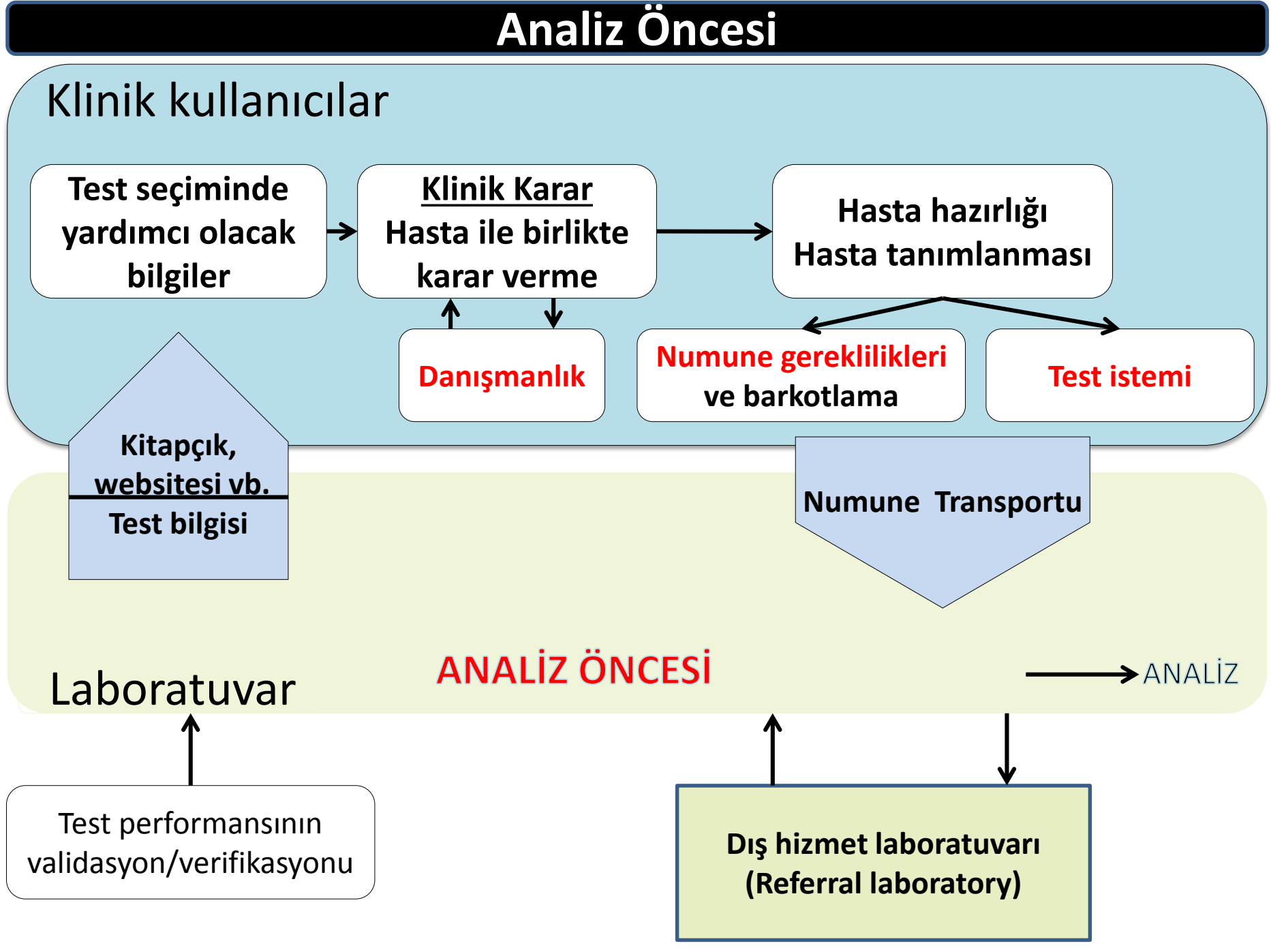
## Laboratuvar

**ANALİZ ÖNCESİ**

ANALİZ

Test performansının validasyon/verifikasyonu

Dış hizmet laboratuvarı  
(Referral laboratory)



## Analitik Evre

### “Kalite Kontrol alışmaları”



- Kontrol planı oluşturulmalıdır.
- Resmi ya da akreditasyon gereklilikleri dikkate alınmalıdır.
- Tüm sonuçlar kayıt altına alınmalıdır.

# Kontrol tipleri:

- **Orijin temelli**
  - Genomik kontrol
  - Sentetik kontrol
- **Hedef diziler/varyantlar temelinde**
  - Pozitif kontrol
  - Negatif kontrol
  - No-template kontrol
- **Analitik süreç temelinde**
  - Ekstraksiyon, amplifikasyon, saptama, hibridizasyon, endojen, eksternal RNA, internal kontroller.



# Analiz Sonrası

## Test raporu kapsamı:

- Cinsiyet
- Yaş
- Etnik köken
- Aile hikayesi
- Test sonuçları ve yorumu
- Tavsiyeler, uyarı ve ilave bilgiler

# Moleküler Genetik Test Rapor Örneği

Hasta Adı: XXXX  
Kimlik No: 03890743  
Dođum Tarihi: 02/11/1981  
Cinsiyet: Kadın  
Test istemi: Dr. XXX  
Rapor Tarihi: 15/03/2014

## Kiři ve Aile Bilgisi (Kistik Fibrozis)

Etnik köken : Kafkas  
Aile anamnezi: Negatif  
Kiři anamnezi: Negatif

Uygulanan Test: *CFTR mutasyon panel analizi*  
Test Endikasyonu: *Asemptomatik bireyde kistik fibrozis (CF) taşıyıcılık testi*  
Numune Tipi: Kan  
Numune Alınma Tarihi: 05/03/2014

**Sonuç:** c.1521\_1523del (c.1521\_1523delCTT) bir kopyası tanımlandı.  
(NCBI mRNA Referans Sequence [NM\_000492.2])

**Yorum:** Bu kişi CF ile ilişkili mutasyon için taşıyıcıdır.  
Mutasyonun bir çocuğa kalıtılma şansı 1/2 (50 %)’dir.

**Öneri:** Hastalıktan etkilenmiş çocuk sahibi olma riskini ve öteki aile bireylerine etkilerini netleştirmek için genetik konsültasyon tavsiye edilmektedir.

---

**Uyarı:** DNA alışmaları tüm kişilerde kistik fibrozis taşıcılığı için kesin sonuç bildirmez. Bundan dolayı bu test ile ilgili yorumlar olasılık bildirmektedir. PCR reaksiyonlarında eser düzeyde kontaminasyon bile genotiplendirme hatalarına neden olabilir.

**İlave Bilgi:**

Bir mutasyona sahip olan bireyler taşıyıcı olarak tanımlanırlar ve klinik olarak etkilenmemişlerdir.

**Test Metodu:** *CTFR* geni aşağıda listelenen mutasyonların varlığı bakımından PCR ve allel spesifik oligonükleotit hibridizasyon ile test edildi. Bu test, FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylandı.

**\*\* Aşağıdaki kistik fibrozis (CF) gen mutasyonları test edildi.\*\***

**c.1519\_1523del(c.1519\_1521delATC)      c.1657C>T      c.3484C>T**  
**c2988+1G>A      c.1519\_1521(c.1519\_1521delATC)      c.1624G>T**

---

# Testlerin Kalitesinin Değerlendirilmesi

## Dış Kalite Programı:

- Tüm test sürecini içerecek şekilde ya da sadece analiz/yorum sürecini içerecek şekilde olabilir.
  - \*Bazı ülkelerdeki düzenlemeler **yılda iki kez** dış kalite numunesi çalışılmasını gerektirir.

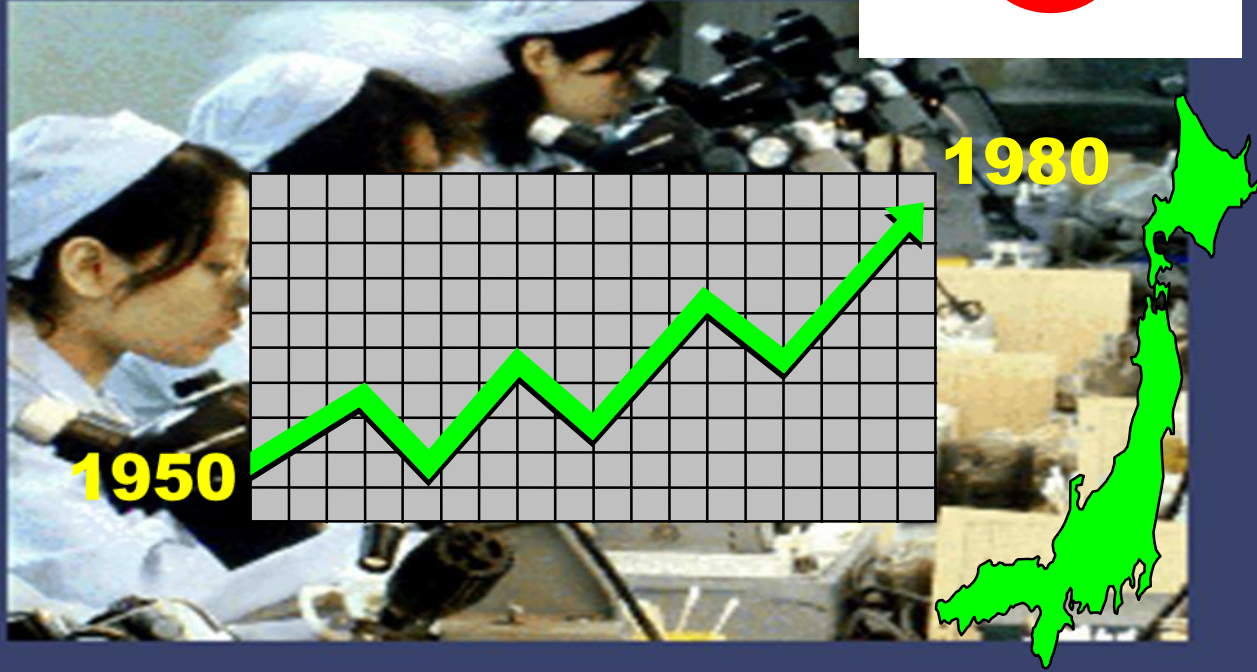
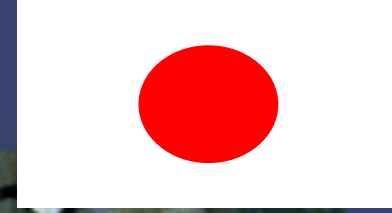
## Alternatif Performans Deęerlendirmeleri:

- Laboratuvarlararası karşılaştırma
- Farklı bir metot ile karşılaştırma

# Sonuç olarak;

- Kullanıcılar (hastalar ve klinisyenler) moleküler genetik testlere oldukça güveniyorlar.
- Ancak, yaşanmış hikayeler ve bilimsel değerlendirmeler hata oranının yüksek olduğunu göstermekte.
- Kapsamlı ve standartlara uygun bir şekilde **“kalite yönetim sistemi”** uygulanmalıdır.

# Japanese factory workers



Dr. Edwards DEMING

1961

**Eğer beni dinlerseniz  
beş yıl içinde dünya' yı  
yakalayabilirsiniz,**

**eğer dinlemeye devam  
ederseniz dünya sizi  
yakalamak için çok  
uğraşır.**