



## شناسنامه و استاندارد خدمت

آزمایش تشخیص مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

پاییز ۱۴۰۱

**تنظیم و تدوین:**

**مرکز آموزشی پژوهشی درمانی سل و بیماریهای ریوی دکتر مسیح دانشوری**

**گروه علمی آسیب شناسی ایران**

**گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران**

**گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران**

**آزمایشگاه مرجع سلامت**

**مرکز مدیریت بیماریهای واگیر**

**تحت نظارت فنی:**

**دکتر سید موسی طباطبایی لطفی**

**دکتر ساناز بخشنده**

**گروه استانداردسازی و تدوین راهنماهای سلامت**

**دفتر ارزیابی فن آوری، استانداردسازی و تعرفه سلامت**

## الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین) به همراه کد ملی:

کد ملی در کتاب ارزش نسبی خدمات و مراقبت‌های سلامت: ۸۰۵۰۹۲

شرح خدمت: PCR کیفی برای MTB (آزمایش تشخیص مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس)

## ب) تعریف و تشریح خدمت مورد بررسی :

### کاربرد/تفسیر نتیجه آزمایش

۱. روش رنگ آمیزی مستقیم از دقت و حساسیت پایینی برخوردار است و کشت خلط زمانی طولانی را می طلبد. از طرفی شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسط روش‌های فوتوپتی به علت رشد آهسته باکتری بسیار زمان بر و پرهزینه می باشد. بنابراین روشی آسان و حساس به عنوان مکمل و مؤید تشخیص بالینی روش Real-time PCR است که از حساسیت، دقت و سرعت کافی برخوردار است. جایگاه‌های متفاوتی در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه قرار گرفته است؛ از جمله ژن *IS 6110*، آنتی ژن *phoS*، آنتی ژن *MPB64* و آنتی ژن *Gro EL*. از بین این موارد *IS 6110* به علت تکرار در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. خصوصیت تکراری بودن این قطعه در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باعث افزایش حساسیت Real-time PCR می شود که از تکثیر یک توالی DNA واحد به دست می آید. به این معنی که یک DNA واحد دارای چندین بخش قابل تکثیر می باشد و احتمال اتصال پرایمرها در حضور مقادیر اندک DNA نیز افزایش می یابد. نکته دیگر در مورد این قطعه حضور آن تنها در مایکوباکتریومهای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که این خود یک نکته مناسب دیگر برای به کارگیری این قطعه در تشخیص مولکولی مایکوباکتریوم می باشد با توجه به مزایای روش Real-time PCR نسبت به روش PCR معمولی که شامل افزایش دقت، افزایش حساسیت (حتی با وجود یک کپی از توالی هدف)، افزایش محدوده تغییر و قدرت تفکیک بالاتر می باشد، استفاده از آن می تواند در کنترل درمان و پیشگیری از بازگشت بیماری نقش بسزایی ایفا نماید روش Real-time-PCR تکنیکی است که به طور گسترده در بررسیهای کمی و کیفی بیان ژن به کار میرود. همچنین روشی بسیار قدرتمند و حساس در شناسایی عوامل بیماری موجود در یک نمونه است. ویژگی کلیدی Real-time PCR، فراهم شدن امکان بررسی تکثیر قطعات DNA همزمان با انجام گرفتن آزمایش و با استفاده از گزارشگرهای فلوروسنت (fluorescent reporters) میباشد. قدرت سیگنال فلوروسنت تولید شده ارتباط مستقیمی با مقدار مولکولهای تکثیرشده دارد. این تکنیک در آزمایشهای مختلف تشخیصی، جای PCR عادی را گرفته است. نتیجه این آزمایش بصورت کیفی است و نتیجه با گزارش مثبت یا منفی ارائه می گردد. کلیه فناوری ها و کیت‌های تشخیصی مبتنی بر روشهای تشخیص مولکولی مرتبط با سل، برای استفاده در آزمایشگاه پزشکی، باید دارای مجوزهای قانونی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی باشند. در صورتیکه از روشهای ابداع شده توسط آزمایشگاه برای تشخیص مولکولی استفاده میشود (Home made و یا Laboratory Developed Test)، باید از طریق صحه گذاری (Validation) از اعتبار نتایج آنها اطمینان حاصل شود.

مطابق دستورالعمل و گایدلاین های اداره کنترل سل و جذام مرکز مدیریت بیماریهای واگیر " تعیین گونه مایکو باکتریوم توپرکلوزیس از ابتدای شروع درمان لازم است و افتراق گونه مایکوباکتریومها توسط آزمایشگاه از نمونه بالینی و یا کلنی بدست آمده از کشت نمونه ها انجام می گردد.

**طیف نمونه های بالینی:** بر اساس تظاهر بیماری سل به دو شکل سل ریوی (پارانشیم ریه را درگیر میکند) و سل خارج ریوی (ابتلای سایر اعضای بدن به غیر از ریه ها) نمونه های اخذ شده از بیماران، طیف زیادی خواهد داشت. نمونه های سل ریوی شامل خلط، ترشحات تراشه، بال حاصل از برنکوسکوپی، شستشوی معده (در کودکانی که توانایی دادن نمونه خلط نباشند) نمونه های سل خارج ریوی شامل: ادرار، مایعات آسپیره استریل بدن (مایع مغزی نخاعی، مایع پلورو ... ) ترشحات غدد لنفاوی، بافتها، ترشحات زخمها، مغز استخوان و سایر نمونه ها

برخی از نمونه ها توسط خود بیمار با راهنمایی آزمایشگاه اخذ می شوند مانند خلط ، ادرار و ترشحات زخمها اما تعدادی از نمونه ها الزاما در بیمارستانها تحت نظارت پزشک یا پرستار بیمار اخذ میگردد.

**انتقال نمونه ها:** انتقال نمونه های مشکوک به سل مطابق دستورالعمل ارجاع و انتقال امن و ایمن نمونه ها و در سیستم بسته بندی انتقال نمونه های عفونی سه محفظه ای سازمان بهداشت جهانی باید انجام پذیرد. به طور کلی عوامل زیر در حساسیت آزمایش تشخیص مولکولی و اعتبار نتایج آن مهمترین تاثیر را دارند :

- نحوه جمع آوری نمونه ها
- رعایت استانداردهای تضمین کیفیت آزمایشگاهی در نگهداری و ارسال نمونه و انجام آزمایش
- نوع کیت تشخیص مولکولی یا راهنما آزمایشگاهی که برای تشخیص مورد استفاده قرار می گیرد

فناوری ها و روشهای آزمایشگاهی مورد استفاده (Probe Hybridization, TMA , Conventional PCR, Real-time PCR)

داده عددی در مورد اعتبار نتیجه آزمایش (مثبت و منفی کاذب)، منابع خطای احتمالی،

**(ت) موارد ضروری انجام مداخله تشخیصی (اندیکاسیون ها) توسط پزشک تکمیل تر گردد**

- همه بیماران مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت که در مرحله اسمیر میکروسکوپی گزارش اسید فست مثبت دارند.
- همه بیماران مبتلا به سل که کشت مثبت دارند. بسته به اینکه اسمیر مثبت یا اسمیر منفی از نظر اسید فست داشته باشند.
- همه بیمارانی که مقاومت به ریفامپین آنها احراز شده است.

**ج) تواتر ارائه خدمت:**

**ج-۱) تعداد دفعات مورد نیاز**

به تشخیص پزشک، در صورت منفی شدن نتیجه آزمایش یک فرد مشکوک به سل، به منظور کاهش احتمال منفی کاذب، آزمایش تکرار میشود.

## ج-۲) فواصل انجام

بر اساس صلاحدید و درخواست پزشک و شرح حال و سیر بالینی بیمار و بر اساس آخرین ضوابط و دستورالعمل های ابلاغی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

### د) افراد صاحب صلاحیت جهت تجویز (Order) خدمت مربوطه و استاندارد تجویز:

اولویت اول : پزشک ( دکترای عمومی، متخصص، فوق تخصص) و پزشکان هم‌هنگ کننده سل

اولویت دوم: کارشناسان واحد مبارزه با بیماریهای دانشگاهها که بر اساس آخرین ضوابط و دستورالعمل های وزارت بهداشت درمان و

آموزش پزشکی و اندیکاسیونهای اداره کنترل سل و جذام و سیستم نظام ارجاع تعیین می شوند •

ثبت درخواست و سایر اطلاعات مورد نیاز در سامانه های وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی یا سامانه های تجویز الکترونیک الزامی است.

### ه) افراد صاحب صلاحیت جهت ارائه خدمت مربوطه:

انجام آزمایش: آزمایش تشخیص مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از آزمایشهای تخصصی بوده که بر اساس تبصره یک ماده ۲ آیین نامه تاسیس و مدیریت امور آزمایشگاههای پزشکی فقط در آزمایشگاههای تخصصی صاحب صلاحیت باید انجام شود. این آزمایشگاهها باید طبق بخشنامه ها و دستورالعمل های ابلاغی، دارای مجوزهای لازم از وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی بوده، الزامات تضمین کیفیت و اصول ایمنی و امنیت زیستی را رعایت کرده و در برنامه های مهارت آزمایی مورد تایید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی (آزمایشگاه مرجع سلامت و مرکز مدیریت بیماریهای واگیر) شرکت نموده و نتیجه قابل قبول اخذ نمایند. این آزمایشگاهها بر اساس چک لیستهای ابلاغی وزارت بهداشت به صورت دوره ای توسط مدیریت امور آزمایشگاههای دانشگاههای تابعه باید مورد ارزیابی قرار گیرند. افراد دارای صلاحیت انجام آزمایش: کارکنان آزمایشگاه آموزش دیده، تحت نظارت مسئول فنی آزمایشگاه. مدارک تحصیلی مورد تایید کارکنان برای انجام آزمایش در بند " و " مشخص شده اند.

مسئول فنی صاحب صلاحیت که کل فرآیند مدیریت نمونه، روند انجام آزمایش، تضمین کیفیت آزمایش، گزارش دهی، یافتن خطاهای احتمالی در روند ارائه خدمت آزمایشگاهی، پاسخگویی به پزشک، بیماران و دیگر ذی نفعان و انجام سایر وظایف مرتبط را بر عهده داشته و همچنین از ضوابط تعیین شده از طرف وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مانند ثبت اطلاعات مورد درخواست در سامانه های مربوطه آگاهی کامل دارد.

(و) عنوان و سطح تخصص های مورد نیاز (استاندارد) برای سایر اعضای تیم ارائه کننده خدمت:

ردیف	عنوان تخصص	تعداد مورد نیاز به طور استاندارد به ازای ارائه هر خدمت	میزان تحصیلات مورد نیاز	سابقه کار و یا دوره آموزشی مصوب در صورت لزوم	نقش در فرایند ارائه خدمت
۱	پرسنل آزمایشگاه	۲ نفر	کارشناس آزمایشگاه، کارشناس های ژنتیک، میکروب شناسی، زیست شناسی سلولی و مولکولی، کارشناس ارشد و PhD تک رشته ای ها، دکترای علوم آزمایشگاهی، متخصص آسیب شناسی متخصص علوم آزمایشگاهی بالینی که در مراکز معتبر و ذیصلاح آموزش دیده و تحت ارزیابی صلاحیت دوره ای قرار داشته باشند		استخراج DNA و انجام آزمایش
۲	مسئول فنی	۱ نفر	متخصص آسیب شناسی، متخصص علوم آزمایشگاهی بالینی، دکترای علوم آزمایشگاهی بالینی، دکترای تخصصی تک رشته ای شامل رشته های میکروبیشناسی، ویروس شناسی، باکتری شناسی، خون شناسی، قارچ شناسی، انگل شناسی، بیوشیمی، ایمنی شناسی و ژنتیک پزشکی	وظایف مسئول فنی بر اساس آیین نامه تاسیس و مدیریت امور آزمایشگاههای پزشکی	تایید نتیجه آزمایش و سایر وظایف مسئول فنی بر اساس دستورالعمل ها و بخشنامه های ابلاغی

(ز) استانداردهای فضای فیزیکی و مکان ارائه خدمت:

مطابق دستورالعمل مرکز مدیریت بیماریها و تعریف سطح بندی خدمات آزمایشگاهی این خدمت در آزمایشگاه کشت سل دانشگاه و آزمایشگاههای مرجع منطقه ای سل و آزمایشگاه مرجع کشوری سل یا آزمایشگاههای اعتباربخشی شده توسط آزمایشگاه مرجع سلامت تحت نظارت مسئول فنی آزمایشگاه انجام خواهد گرفت. در صورت غیرفعال نمودن نمونه در آزمایشگاههای سطح ایمنی ۲ قابل انجام است اما اگر نمونه بدلیل انجام آزمایش کشت نیاز باشد نباید غیر فعال گردیده و لزوما در آزمایشگاه دارای ایمنی ۲+ (BLS 2 plus) کار می شود.

### ح) تجهیزات پزشکی سرمایه ای به ازای هر خدمت:

تجهیزات دستگاهی اصلی شامل مواردی میشود که در انجام آزمایش مورد استفاده قرار میگیرند. در صورت استفاده از Real-time PCR آزمایشگاه باید، علاوه بر سایر تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز به دستگاه ترمال سایکلر مناسب برای این روش مجهز باشد. در صورتیکه از سیستمهای بسته برای انجام آزمایش استفاده میشود دسترسی به کیت و تجهیزات دستگاهی مربوطه ضروری است.

ردیف	اقدام سرمایه ای مورد نیاز	تعداد مورد نیاز
۱	دستگاه ترمال سایکلر و ملحقات (Real Time PCR)	۱
۲	رایانه و پرینتر	۱
۳	کابینت ایمنی بیولوژیک کلاس ۲	۱
۴	یخچال	۱
۵	فریزر منهای ۲۰ درجه یا منهای ۷۰ درجه سانتیگراد	۱
۶	PCR Work Station with UV-C Lamp	۲
۷	میکروپیپت در اندازه های مختلف	۲
۸	هیتر بلاک	۱
۹	Micro spin	۱
۱۰	سانتریفوژ	۱
۱۱	اتوکلاو	۱

(ط) داروها، مواد و لوازم مصرفی پزشکی جهت ارائه هر خدمت:

ردیف	اقلام مصرفی مورد نیاز	میزان مصرف (تعداد یا نسبت) به ازاء هر تست
۱	ظرف مخصوص انتقال نمونه	به تعداد مورد نیاز
۲	Ice pack جهت انتقال نمونه	به تعداد مورد نیاز
۳	کیت استخراج اسید نوکلئیک و PCR	تعداد تست قابل انجام توسط هر کیت ۷۰ درصد ظرفیت تعیین شده توسط کیت خواهد بود.
۴	سرسمپلر فیلتردار DNase, RNase Free	۱۵ عدد به ازای هر نمونه (با توجه به حجم های مختلف)
۵	پرایمر های forward و Reverse	به تعداد مورد نیاز
۶	Probe	به تعداد مورد نیاز
۷	Master Mix	به تعداد مورد نیاز
۸	Internal Control/ Exogene	به تعداد مورد نیاز
۹	میکروتیوب های DNase, RNase Free	به تعداد مورد نیاز
۱۰	رک نگهداری نمونه و DNA استخراج شده	به تعداد مورد نیاز
۱۱	رک مخصوص حمل و نقل نمونه در حین انجام آزمایش	به تعداد مورد نیاز
۱۲	سری سمپلر کالیبر و استاندارد در حجم های ۱۰ و ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر متغیر	۳



۲ سی سی به ازای هر نمونه	الکل مطلق	۱۳
دو لیتر ماهیانه	الکل جهت ضد عفونی	۱۴
۱۰ جفت در هر ران کاری	دستکش لاتکس بدون پودر	۱۵
به ازاء هر ران کاری یک عدد	تجهیزات حفاظت فردی (گان، عینک، شیلد)	۱۶
به تعداد مورد نیاز	Safety box	۱۷

## ظ) اقدامات پاراکلینیکی، تصویربرداری و دارویی مورد نیاز قبل از ارائه خدمت:

آمادگی بیمار برای نمونه های بالینی متفاوت نیاز به اقدامات اولیه نیست

## ی) استانداردهای گزارش (شامل مشاهده ها و اندازه گیری های ضروری):

گزارش نتیجه بر اساس تشخیص گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس یا مایکوباکتریوم غیر توبرکلوز (NTM) ارائه می گردد. ضوابط و استانداردهای آزمایشگاه ارائه دهنده خدمت (تبصره یک ماده دو آئین نامه تاسیس و مدیریت آزمایشگاه پزشکی)، ارزیابی نظارتی (تضمین کیفیت و ایمنی و امنیت زیستی)، مهارت آزمایی، ثبت و تبادل داده با سامانه های تعیین شده توسط وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ( اداره کنترل سل و جذام مرکز مدیریت بیماریهای واگیر ) می باشد.

## گ) شواهد علمی در خصوص کنتراندیکاسیون های دقیق خدمت:

کاربرد ندارد.

## ل) مدت زمان ارائه هر واحد خدمت:

Turn around time مدت زمان ارائه این خدمت آزمایشگاهی، از نمونه گیری تا پاسخدهی حداکثر ۴۸ ساعت می باشد. در مواقع اورژانس مانند مننژیت سلی می تواند چند ساعت تا حداکثر ۲۴ ساعت کاهش یابد.

## ف) موارد ضروری جهت آموزش به بیمار

نمونه تنفسی (خلط) نمونه گیری ادرار و نمونه گیری از ترشحات زخم که در آزمایشگاه نمونه گیری از بیماران سرپائی انجام می گیرد. نمونه های دیگر تحت نظارت پزشک یا پرستار در مراکز درمانی از بیمار بستری گرفته می شود.

## منابع

### منابع فارسی:

۱. راهنمای کشوری مبارزه با سل – مصوب کمیته فنی کشوری مبارزه با سل

۲. منابع باکتری شناسی

### منابع غیر فارسی:

1. Tietz clinical guide to laboratory tests—4th ed. / [edited by] Alan H.B. Wu., ISBN 0-7216-7975-7
2. Sankar, Sathish, et al. "Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of Mycobacterium tuberculosis: possible implications for PCR based detection." *Bioinformatics* 6.7 (2011): 283