



شناسنامه و استاندارد خدمت

آزمایش تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به داروی ریفامپین
به روش تشخیص ملکولی

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:

این خدمت در حال حاضر در کتاب ارزش نسبی خدمات و مراقبت‌های سلامت وجود ندارد.

متن پیشنهاد شرح خدمت: آزمایش تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به داروی ریفامپین به روش تشخیص ملکولی

Infectious agent drug susceptibility phenotype prediction using regularly updated genotypic bioinformatics

ب) تعریف و تشریح خدمت مورد بررسی:

کاربرد/تفسیر نتیجه آزمایش:

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری عفونی و مزمن سل می باشد که پس از انتقال از طریق ریوی می تواند استخوان، سیستم اعصاب مرکزی و بسیاری از اعضا را درگیر کند. این میکروارگانیسم همچنان با وجود واکسیناسیون گسترده (BCG) و داروهای ضد سلی از عوامل اصلی کشنده در بین بیماری های عفونی محسوب می شود. درمان و پیشگیری عفونت های مایکوباکتریایی بر خلاف سایر عفونت های باکتریایی، پیچیده و مشکل است. مایکوباکتریوم های کند رشد نسبت به اکثر آنتی بیوتیک های تجویز شده برای درمان سایر عفونت های باکتریایی مقاومت دارویی چند گانه و مقاومت دارویی گسترده در تمامی نواحی دنیا مشاهده شده است. بنابراین بررسی خصوصیات ژنتیکی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به آنتی بیوتیک ها برای کنترل شیوع مقاومت دارویی و به حداقل رساندن انتقال سویه های مقاوم از اهمیت ویژه ای برخوردار است. پیدایش و انتشار سل مقاوم به دارو های خط اول ضد سل دارای اهمیت زیادی می باشد. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۰ میلادی آلوده شدن بیش از ۵۰ میلیون نفر با میکروب سل مقاوم به چند دارو در سراسر جهان را گزارش داده است

ایزوله های جدا شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از لحاظ مقاومت به داروی ریفامپین (از داروهای خط اول)، از نظر ژنتیکی با روشهای مختلف مولکولی بررسی می گردد تا به الگوی تغییرات ژنتیکی در ژن هایی که مسئول مقاومت دارویی آنها بوده دست یافته و نتیجه آزمایش بر اساس مقاوم یا حساس بودن به داروی ریفامپین گزارش می گردد.

برای تعیین مقاومت دارویی ریفامپین ژن *rpoB* / از لحاظ وجود جهش بر روی نواحی ۵۱۶ و ۵۲۶ و ۵۳۱ مورد مطالعه قرار میگیرد . نمونه های مشکوک به سل بعد از جمع آوری از نقاط مختلف و ارسال به آزمایشگاه جهت انجام کارهای مولکولی در ۲۰- درجه ذخیره می شود. بعد از استخراج DNA ، طراحی پرایمر برای ژن *rpoB* انجام گردد. درصد فراوانی جهش شناسائی شده در ژن *rpoB* ۹۵٪ گزارش شده است .

خدمت آزمایشگاهی تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به داروی ریفامپین به روش تشخیص مولکولی یک خدمت تخصصی محسوب می شود و مشمول تبصره 1 ماده 2 آئین نامه تاسیس و مدیریت آزمایشگاههای پزشکی شده و رعایت ضوابط وزارت متبوع در مورد آن الزامی می باشد. کلیه آزمایشگاههای پزشکی، برای ارائه خدمت تشخیص مولکولی فوق، باید مطابق فرآیند صدور مجوز ارائه خدمت تخصصی تشخیص مولکولی، مجوز لازم را از وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی دریافت نمایند.

کلیه فناوری ها و کیت های تشخیصی مبتنی بر روش های تشخیص مولکولی مرتبط با سل، برای استفاده در آزمایشگاه پزشکی، باید دارای مجوزهای قانونی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی باشند. در صورتیکه از روش های 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.

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

ت) موارد ضروری انجام مداخله تشخیصی (اندیکاسیون ها)

- همه بیماران مشکوک به سل ریوی که گزارش آزمایش میکروسکوپی اسمیر اسید فست آنها مثبت است.
- همه بیماران مشکوک به سل که کشت مثبت دارند. اعم از اینکه گزارش آزمایش میکروسکوپی اسمیر اسید فست آنها مثبت یا منفی باشد.
- آزمایش تشخیص مولکولی برای تشخیص سل، مثبت باشد.
- همه بیمارانی که مقاومت به درمان با ریفامپین در آنها احراز شده باشد اعم از اینکه قبلا آزمایش تشخیص مقاومتشان مثبت یا منفی باشد.

ج) تواتر ارائه خدمت:

ج-۱) تعداد دفعات مورد نیاز

به تشخیص پزشک در مرحله اول تشخیص مورد مثبت یا پس از پایان مرحله اول درمان بیمار مبتلا به سل در صورت مشاهده علائم مقاومت دارویی (مثبت شدن اسمیر میکروسکوپی پس از پایان ماه دوم درمان) و بر اساس آخرین ضوابط و دستورالعمل های ابلاغی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

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 هماینگ 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.

هـ) افراد صاحب صلاحیت جهت ارائه خدمت مربوطه:

انجام آزمایش: آزمایش تشخیص مولکولی تعیین مقاومت دارویی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به ریفامپین 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	وظایف مسئول فنی بر اساس آیین نامه تاسیس و	تایید نتیجه آزمایش و سایر وظایف مسئول فنی

بر اساس دستورالعمل ها و بخشنامه های ابلاغی	مدیریت امور آزمایشگاههای پزشکی	شناسی، انگل شناسی، بیوشیمی، ایمنی شناسی و ژنتیک پزشکی			
---	--------------------------------------	---	--	--	--

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

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

مورد ندارد

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

گزارش نتیجه بر اساس مقاوم یا حساس بودن نمونه مایکوباکتریوم توپرکلوزیس مورد آزمایش نسبت به داروی ریفامپین 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 ۷۲ 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:

- Tietz clinical guide to laboratory tests—4th ed. / [edited by] Alan H.B. Wu., ISBN 0-7216-7975-7
- Caws, M., et al., Mutations prevalent among rifampin-and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from a hospital in Vietnam. Journal of clinical microbiology, 2006. 44(7): p. 2333-2337.
- Wada, T., et al., Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR. Journal of clinical microbiology, 2004. 42(11): p. 5277-5285.
- Wang, K., et al., The Expression of ABC Efflux Pump, Rv1217c–Rv1218c, and Its Association with Multidrug Resistance of Mycobacterium tuberculosis in China. Current microbiology, 2013. 66(3): p. 222-226