

جلد ۲۲

مجموعه سوالات

بر اساس هفتری ۲۰۲۲

پاتولوژی بالینه

با طبقه‌بندی موضوعی و پاسخ تشریحی
فصل‌های ۵۸ و ۵۹

آزمون‌های ارتقاء و بوردر رشته پاتولوژی، علوم آزمایشگاهی
و رشته‌های گروه علوم پزشکی وزارت بهداشت

ترجمه و نگارش
دکتر مهسا ضیائی اردستانی
متخصص پاتولوژی

فہرست

۶		مقدمہ
۹		فصل ۵۸ In vitro testing of antimicrobial agents
۱۲۵		فصل ۵۹ Mycobacteria

به نام خدا

مقدمه

مجموعه پیش رو شامل سوالات مرتبط با رشته پاتولوژی، زیر شاخه پاتولوژی کلینیکال (Clinical pathology & laboratory medicine) می باشد که بر اساس کتاب Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods (24th edition) مورد طبقه بندی موضوعی به شکل سطر به سطر قرار گرفته است. در نگارش این کتاب از آزمون های ارتقاء و مورد رشته پاتولوژی، دوره های تکمیلی علوم آزمایشگاهی و برخی آزمون های وزارت بهداشت استفاده شده است. همچنین، به جهت درک بهتر مطالب، از منابع و عکس های مختلف استفاده شده است. امید است مجموعه حاضر مورد توجه دانش پژوهان قرار گیرد. بیان هر گونه نواقص احتمالی کتاب مزید امتنان خواهد بود.

دکتر مهسا ضیائی اردستانی، متخصص پاتولوژی
ziaeiardestani@gmail.com

در هر حرفه‌ای که هستید نه اجازه دهید که به بدبینی‌های بی‌حاصل آلوده شوید و نه بگذارید که بعضی لحظات تأسفبار که برای هر ملتی پیش می‌آید، شما را به یأس و ناامیدی بکشاند. در آرامش حاکم بر آزمایشگاه‌ها و کتابخانه‌هایتان زندگی کنید.

نخست از خود بپرسید: من برای خودآموزی و یادگیری چه کرده‌ام؟ سپس همچنان که پیشتر می‌روید بپرسید: من برای کشورم چه کرده‌ام؟ و این پرسش را آن قدر ادامه دهید تا به این احساس شادی‌بخش و هیجان‌انگیز برسید که شاید سهم کوچکی در پیشرفت اعتلای بشریت داشته‌اید.

اما هر پاداشی که زندگی به تلاش‌هایمان بدهد یا ندهد، هنگامی که به پایان تلاش‌هایمان نزدیک می‌شویم، هر یک از ما باید حق آن را داشته باشیم که با صدای بلند بگوییم: من هر چه در توان داشته‌ام، انجام داده‌ام.

لویی پاستور

In vitro testing of antimicrobial agents

آزمایش‌های روتین ادغام شده‌اند، زیرا تأخیر مرتبط با ایزولاسیون پاتوژن را از بین می‌برند. آزمایش‌های حساسیت ضد میکروبی فنوتیپی ممکن است بر اساس نقطه پایانی endpoint مورد استفاده، یعنی مهار رشد باکتری یا کشتن آن، طبقه‌بندی شوند. در بیشتر موارد، مهار رشد پارامتری است که در آزمایشگاه استفاده می‌شود و به شکل محدود، تنها در شرایط بسیار خاص، از killing endpoint یا (bactericidal) استفاده می‌شود.

Guidance documents for in vitro testing of antimicrobial agents

صرف نظر از اینکه آزمایشگاه کدام روش دایلوژن یا آزمایش انتشار دیسک را انتخاب کند (آزمایشگاه‌ها معمولاً ترکیبی از روش‌ها را برای رفع نیازهای خود انتخاب می‌کنند)، یک روش استاندارد شده^۱ از اهمیت بالایی در کسب نتایج صحیح و تکرارپذیر^۲ برخوردار است. سازمان‌های استاندارد مختلف در مکان‌های مختلف در سراسر جهان این پارامترها را تعیین و منتشر کرده‌اند. در ایالات متحده،^۳ CLSI این نقش را ایفا می‌کند. سازمان‌ها و نهادهای مختلفی در آمریکا، در کمیته فرعی آزمایش حساسیت ضد میکروبی تحت کمیته منطقه‌ای میکروبیولوژی CLSI برای ایجاد استانداردهای لازم با یکدیگر همکاری کرده‌اند:

INTRODUCTION AND DEFINITIONS

آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی (AST) در آزمایشگاه‌های بالینی با استفاده از روش‌های مختلفی انجام می‌شود، اما در حال حاضر، روش‌های فنوتیپی همچنان روش اصلی آزمایش هستند. روش‌های فنوتیپی شامل چند مرحله است:

- ◆ جداسازی پاتوژن مورد آزمایش
- ◆ قرار دادن پاتوژن در معرض ماده ضد میکروبی
- ◆ ارزیابی بیان یا عدم بیان مقاومت به آنتی‌بیوتیک

این فرآیند می‌تواند پرزحمت و زمان‌بر باشد و شاید در برخی شرایط برای بیمار، آزمایشگاه یا هر دو مضر باشد. علیرغم این مشکلات، روش‌های فنوتیپی در حال حاضر رایج‌ترین و در بسیاری از موارد، مقرون به صرفه‌ترین راه برای انجام آزمایش حساسیت هستند. روش‌های فنوتیپی شامل روش‌های زیر است:

- ✓ broth dilution
- ✓ agar dilution
- ✓ disk diffusion
- ✓ gradient diffusion

سیستم‌های تجاری مبتنی بر روش‌های فنوتیپی، کار و زمان لازم برای تشخیص بیان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کاهش داده‌اند و در بسیاری از آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نهایت، روش‌های جدیدتر آزمایش (عمدتاً مولکولی)، که برخی از آنها می‌توانند مستقیماً روی نمونه‌های بیمار انجام شوند، بیشتر در

¹ standardized procedure

² accurate and reproducible results

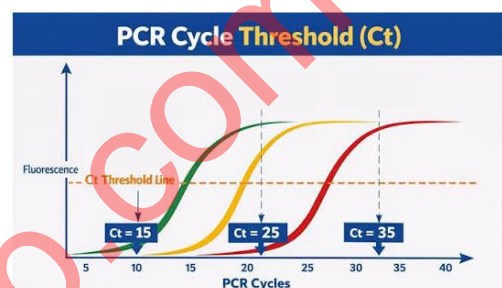
³ Clinical and Laboratory Standards Institute

مقاومت چندگانه (OXA, NDM, KPC, MRSA, VIM, IMP و CTX-M) را مستقیماً از نمونه‌های کشت خون شناسایی کند. حساسیت گزارش شده برای استافیلوکوک اورئوس بیش از ۹۵٪ است. برای کارباینها، حساسیت و ویژگی بالای ۹۷٪ است.



یکی دیگر از سیستم‌های شناسایی سریع کشت خون که شامل عوامل تعیین‌کننده ژن مقاومت نیز هست، **Biofire FilmArray** می‌باشد. این سیستم یک سیستم بسته closed است که PCR مولتی‌پلکس را برای تشخیص پاتوژن‌های متعدد و همچنین ژن‌های مقاومت KPC, mecA و vanA/B انجام می‌دهد. سیستم‌های Verigene و BioFire در مقایسه رو در رو، برای پاتوژن‌ها و ژن‌های مقاومت مشابه، عملکرد خوبی از خود نشان داده‌اند. جدیدترین سیستم **GeneMark Dx ePlex Blood Culture ID system**

ژن vanB فاقد ویژگی مناسب ذکر شده است (علت نتیجه مثبت کاذب در این حالت، ژن vanB مربوط به سایر باکتری‌های موجود در فلور روده مانند گونه‌های کلوستریدیوم است). **Xpert vanA/vanB assay** نیز نتایج مثبت کاذب برای vanB نشان داده است، اما اگر آزمایش روی enriched broths انجام شود و به شرط تنظیم C_T cutoff در حد مناسب، عملکرد سنجش تا حد زیادی بهبود می‌یابد و نتایج مثبت کاذب کاهش می‌یابد.^۱



Cycle threshold (Ct) values represent the number of amplification cycles required for the fluorescent signal to exceed the basal threshold level.

هر دو روش می‌توانند ژن‌ها را در عرض چند ساعت تشخیص دهند؛ Birgand و همکارانش (۲۰۱۳) دریافتند که این امر منجر به تأثیر قابل‌توجهی بر اقدامات کنترل عفونت و صرفه‌جویی در هزینه‌ها در یک بیمارستان فرانسوی شده است.

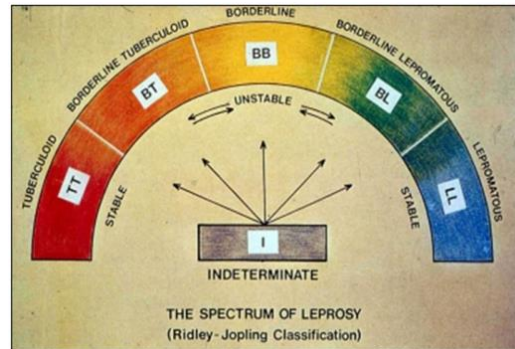
Multiplex panels اغلب ترکیبی از ژن‌های مقاومت برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را تشخیص می‌دهند. **Verigene Gram Positive and Gram Negative Blood Culture Test** یک سنجش مبتنی بر ریزآرایه است که می‌تواند باکتری‌ها و ژن‌های

¹ Because of the observed decline in CT values of the broths, we adjusted the cutoff value for PCR positivity of the Xpert assay on broth to 25 (بر اساس مقاله اشاره شده در کتاب).

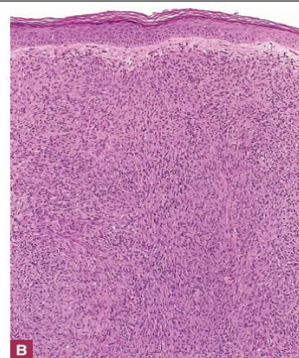
جذام لپروماتوز با ضایعات پوستی از درگیری منتشر و عمومی پوست تا ندول‌های منتشر با توزیع قرینه و متقارن پر از ارگانیسم (به نام لپروم) مشخص می‌شود.

ضایعات معمولاً قسمت‌های خنک‌تر سطح بدن را درگیر می‌کنند: یک سوم قدامی چشم، مخاط بینی و تنه‌های اعصاب محیطی سطحی. در بیماری پیشرفته، به دلیل آسیب و درگیری رشته‌های عصبی درم، ضایعات حس خود را از دست می‌دهند. از نظر میکروسکوپی، موارد زیر در ضایعه پوستی دیده می‌شود:

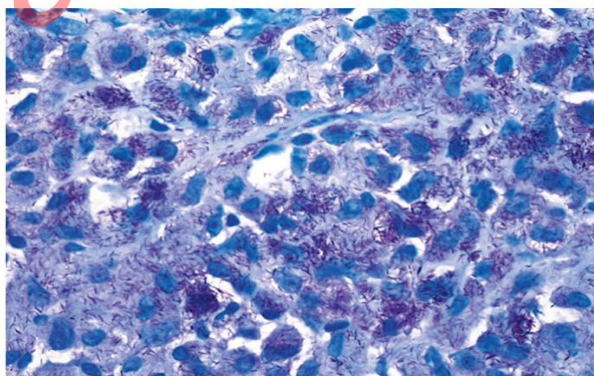
- ✓ foamy histiocytes containing many AFB
- ✓ few or no lymphocytes
- ✓ minimal intraneural inflammation
- ✓ many AFB in nerves, the perineurium, blood vessel walls, and arrector muscles



منظور از آن‌رژی همان mycobacterial-specific anergy است.



▲ FIGURE 19-19 Lepromatous leprosy. (A) Scattered erythematous plaques and nodules on the trunk. (B) Diffuse infiltration of the dermis by foamy macrophages separated from the epidermis by a Grenz zone.



▲ FIGURE 19-21 Lepromatous leprosy. Fite stain of numerous acid-fast bacilli, often clumped into globi.

از تلقیح به محیط کشت، آلودگی‌زدایی decontamination شوند تا از رشد بیش از حد فلور طبیعی و پنهان شدن (ماسکه شدن) حضور مایکوباکتری‌ها که کندتر رشد می‌کنند، جلوگیری شود. تغلیظ نمونه پس از آلودگی‌زدایی، حساسیت اسمیر و کشت را افزایش می‌دهد. نمونه‌هایی از نواحی بدن که معمولاً استریل هستند - خون، CSF، مایع پلورال و پریتونئال (مایع جنب و صفاقی) و بافت‌ها - را می‌توان مستقیماً و بدون آلودگی‌زدایی به محیط کشت تلقیح کرد. پردازش و تلقیح نمونه‌ها برای کشت مایکوباکتریایی باید در کابینت ایمنی بیولوژیکی انجام شود. روش N-acetyl-l-cysteine (NALC)-sodium hydroxide رایج‌ترین روش مورد استفاده در آزمایشگاه بالینی برای مایع‌سازی، آلودگی‌زدایی و تغلیظ^۱ نمونه‌ها جهت تشخیص مایکوباکتری‌ها است (شکل ۱-۵۹). نمونه‌های بالقوه آلوده، در صورتی که امکان پردازش فوری آنها وجود نداشته باشد، باید در یخچال نگهداری شوند. قبل از ادامه مراحل ذکرشده در شکل ۱-۵۹، برای برخی از نمونه‌ها، اقدامات اضافی لازم است.

♦ نمونه‌های لاواژ معده باید فوراً پردازش شوند. اگر تأخیر اجتناب‌ناپذیر باشد، توصیه می‌شود هیدروکسید سدیم ۱۰٪ یا بی‌کربنات سدیم ۱٪ اضافه شود تا pH نمونه خنثی شود. با این حال، داده‌های یک مطالعه نشان می‌دهد که neutralization ممکن است ضروری نباشد. اگر بیش از ۱۰ میلی‌لیتر ترشحات معده جمع‌آوری شود، نمونه به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با نیروی ۳۰۰۰ g تا ۳۶۰۰ g سانتریفوژ می‌شود، مایع رویی تخلیه می‌شود و رسوب طبق دستورالعمل نشان داده شده در شکل ۱-۵۹ پردازش می‌شود.

♦ برای مدفوع، ۱ تا ۲ گرم از نمونه شکل‌گرفته liquid formed sample یا ۵ میلی‌لیتر از نمونه مایع liquid specimen در یک لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری

الف) ویژگی بالاتر در شناسایی افرادی که واکسن BCG دریافت کرده‌اند.

ب) به عنوان تست اسکرین در پرسنل درمانی ارجحیت دارد.

ج) به خونگیری در دو نوبت مختلف نیاز دارد.

د) برای کودکان زیر ۵ سال حساسیت بالایی دارد.

پاسخ: الف

✍ خانم ۲۶ ساله باردار، اهل کشوری با شیوع بالای سل، بدون علائم تنفسی، برای غربالگری سل هفته مراجعه کرده است. در کودکی واکسن BCG دریافت کرده است. تست مناسب پیشنهادی کدام است؟ (بورد ۱۴۰۴)

الف) Tuberculin skin test

ب) Interferon- gamma release assay

ج) Sputum culture

د) Acid- fast staining of sputum

پاسخ: ب

✍ در تفسیر Tuberculin Skin Test (TST)، در بیماری که اندوراسیون ۱۲ میلی‌متری دارد، کدام یک از شرایط زیر در مثبت تلقی شدن تست نقشی ندارد؟

الف) کولکتومی

ب) نارسایی مزمن کلیه

ج) دیابت ملیتوس

د) درمان با کورتیکواستروئید

پاسخ: الف

Laboratory diagnosis SPECIMENS

نمونه‌های توصیه‌شده برای تشخیص عفونت مایکوباکتریایی در جدول ۲-۵۹ (مندرج در صفحه بعد) آمده است. نمونه‌های گرفته‌شده از نواحی آلوده مانند خلط و سایر ترشحات تنفسی، ترشحات معده، ادرار و مدفوع باید پیش

¹ liquefy, decontaminate, and concentrate specimens

موتانت را ردیابی می‌کنند. جایگاه‌های ژنتیکی که معمولاً مورد بررسی قرار می‌گیرند عبارتند از:

- ✓ drug-resistance determining regions of *rpoB*, *emb*, and *gyrA*
- ✓ promoters of *inhA* and *eis*
- ✓ regions of *katG* and *rrs* with established mutations
- ✓ complete open reading frames of *tlyA* and *pnxA*

بسیار مهم: از آنجا که مقاومت دارویی می‌تواند ناشی از موتاسیون‌هایی غیر از موتاسیون‌های توسط این روش‌ها باشد، عدم تشخیص موتاسیون لزوماً به معنای فنوتیپ حساس بودن به دارو نیست. به علاوه، از آنجا که همه مکانیسم‌های مقاومت شناخته نشده‌اند، عدم ردیابی موتاسیون، به طور قطعی مقاومت را رد نمی‌کند. بنابراین، اگرچه روش‌های مبتنی بر مولکولی اطلاعات مفیدی را به سرعت ارائه می‌دهند، اما آنها مکمل آزمایش حساسیت دارویی فنوتیپی هستند، نه جایگزین آن.

پیش از این در این فصل، GeneXpert MTB/RIF assay توضیح داده شد. در رابطه با تشخیص مقاومت به ریفامپین در *M. tuberculosis*، Zeka و همکارانش توافق کامل با agar proportion را برای ۸۹ مورد از ۴۲۹ نمونه‌ای که کشت آنها برای *M. tuberculosis* مثبت بود، گزارش کردند: ۸۸ مورد حساس و ۱ مورد مقاوم بودند. در مقابل، Marlowe و همکارانش (۲۰۱۱) برخی مقاومت‌های کاذب را گزارش کردند. از ۲۱۷ نمونه، ۱۳۰ نمونه از نظر کشت *M. tuberculosis* مثبت بودند. همه ۱۳۰ مورد با روش میکرودایلوشن براث به ریفامپین حساس بودند؛ با این حال، ۳ مورد در ابتدا با روش GeneXpert به ریفامپین مقاوم بودند و ۱ مورد پس از آزمایش مجدد همچنان مقاوم باقی ماند. اخیراً، cartridge, MTB/RIF Ultra با به روز رسانی معرفی شده است که حساسیت آزمایش را بهبود

با این حال، از آنجا که زمان مورد نظر برای آماده‌سازی نتایج به طور متوسط ۲۸ روز پس از دریافت نمونه‌ها در آزمایشگاه است، استفاده از یک سیستم مبتنی بر مایع که توسط FDA تأیید شده و نتایجی معادل با نتایج حاصل از Agar proportion ارائه می‌دهد، توصیه می‌شود. با سیستم‌های مبتنی بر مایع موجود، نتایج معمولاً ۵ تا ۷ روز پس از تلقیح بطری‌ها با ایزوله MTBC در دسترس هستند. حساسیت به تمام داروهای ثانویه باید زمانی آزمایش شود که یک ایزوله به ریفامپین به تنهایی یا هر دو داروی دیگر از داروهای اولیه مقاوم باشد. ایزوله‌هایی که فقط به غلظت بحرانی ایزونیازید مقاوم هستند نیز باید از نظر حساسیت به داروهای ثانویه آزمایش شوند، اگر رژیم درمانی برنامه‌ریزی شده شامل یک فلوروکینولون باشد.

با توجه به اهمیت شناسایی سریع TB مقاوم به دارو، روش‌های مولکولی توسعه یافته‌اند تا کشت‌های مثبت (براث یا کلونی‌ها) یا نمونه‌های اسمیر مثبت AFB از جهت تشخیص موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت مورد ارزیابی قرار گیرند. استفاده از آزمایش مولکولی برای تشخیص مستقیم مقاومت دارویی در نمونه مثبت اسمیر AFB می‌تواند در بیمارانی که سابقه درمان قبلی سل دارند، از کشور یا گروه قومی با مقاومت دارویی بالا می‌آیند، به درمان استاندارد پاسخ نمی‌دهند و/یا در معرض MDR-TB قرار دارند، در نظر گرفته شود. روش‌های مولکولی مبتنی بر پرورب به شرح زیر می‌توانند وجود یا عدم وجود موتاسیون‌ها را تشخیص دهند:

- ✓ Cepheid's GeneXpert MTB/RIF assay using molecular beacons
- ✓ HAIN's MTBDRplus and MTBDRsl assays using line probes

روش‌های مبتنی بر توالی (Sanger sequencing و pyrosequencing) توالی‌هایی از ایزوله‌های وحشی یا